

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR

Departamento de Química

Programa de Pós-graduação em Química

**“Estudo Fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e
sua Interação com Morcegos Frugívoros”**

Sirlei Dias Teixeira

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Química,
para obtenção do título de
doutor em Ciências, área de
concentração em Química
Orgânica

Prof^a Dr^a Beatriz Helena Lameiro Noronha Sales Maia
Orientadora

**Curitiba – PR
2003**

Aos meus pais,

Valêncio e Carmelita,

pela dedicação, incentivo
e presença em minha
vida

**Nunca ande pelo caminho
traçado, ele leva
onde os outros já
foram!**

Graham Bell

Agradecimentos

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

A minha orientadora, Dr^a Beatriz Helena L. N. Sales Maia que indicou os caminhos para a realização deste trabalho e, acima de tudo, esteve ao meu lado como motivadora e amiga em todos os momentos.

A Dr^a Sandra B. Mikich e Gledson V. Bianconi pela condução dos testes de campo

Ao Programa de Pós-graduação – Química – UFPR

Ao Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química – UFPR

Ao LEQSO – Laboratório de Ecologia Química e Síntese Orgânica - UFPR

A Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte pela realização dos testes biológicos

Ao Dr. Marcos Nogueira Eberlin pelos espectros de massas de alta resolução

Ao Laboratório de Ressonância da Universidade Estadual de Maringá - UEM

A FACIPAL – Palmas - PR, pelo incentivo e apoio

Aos meus familiares e amigos que renunciaram a horas de convívio e, muitas vezes, em silêncio, forneceram o apoio necessário para que este trabalho fosse concluído.

A todos que contribuíram, de uma forma ou de outra, para que eu caminhasse até aqui.

E aqui é exatamente o ponto de partida para o futuro...

Resumo

Este trabalho busca um entendimento químico da relação entre *Piper gaudichaudianum* e o seu principal consumidor e dispersor de suas sementes, o morcego frugívoro *Carollia perspicillata*. O estudo foi conduzido no PEVR (Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo), localizado em Fênix – PR. Os morcegos são considerados grandes dispersores de sementes de plantas, exercendo um papel importante na recomposição de ambientes. Este trabalho é pioneiro na área de ecologia química.

Para tanto, fez-se o estudo fitoquímico dos frutos imaturos e maduros de *P. gaudichaudianum*, com o isolamento e a identificação de cinco componentes não voláteis: 5,7-diidroxiflavanona, (**pinocembrina**); 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona; 2-(2'-hidrox-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida; (*E*)-4-(3'-decenil)fenol (**gibbilimbol B**); 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metila. O composto 2-(2'-hidrox-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida é inédito como produto natural. Foram feitas algumas reações de microderivatizações para auxiliar na elucidação estrutural do (*E*)-4-(3'-decenil)fenol.

Uma análise circadiana dos componentes voláteis dos frutos imaturos e maduros dessa planta, obtidos via aeração e hidrodestilação foi feita por CG/EM. Testes de campo foram realizados para verificar o papel do óleo essencial na atratividade de morcegos frugívoros *C. perspicillata*.

Estes testes foram conduzidos, utilizando:

1. o óleo essencial bruto de frutos maduros obtidos por hidrodestilação. Os resultados apontaram para uma atratividade positiva de 80,7%.
2. o componente majoritário identificado na amostra de óleo essencial dos frutos maduros não obtido sinteticamente. O resultado não foi conclusivo.

Finalmente, testes de atividade antimicrobiana foram feitos. As substâncias 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona e 2-(2'-hidrox-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida apresentaram atividade inibitória para os microrganismos *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus faecium*. Já as amostras (*E*)-4-(3'-decenil)fenol e (*E*)-4-(3'-decenil)metoxibenzeno apresentaram resultado positivo apenas contra *Rhodococcus equi*.

Fica evidente o pioneirismo deste trabalho, no enfoque inédito da interação mutualística planta-morcego frugívoro, aliando-se o aspecto biológico ao **aspecto químico** dessa interação.

Abstract

The present work describes a chemical understanding of the relation between *Piper gaudichaudianum* and its main consumer and dispersor of your seeds, the frugivorous bat *Carollia perspicillata*. The study was conducted in the PEVR (Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo), located in Fenix – PR – Brazil

The bats are considered the most important seeds dispersor of plants, having an important function in environmental recovery. It's a pioneer work in chemical ecology area.

For this purpose, the phytochemical study of the ripe and unripe fruits of *P. gaudichaudianum* allowed the isolation and identification of five no volatile components: 5,7-dihydroxy flavanone, (**pinocembrin**); 2,2-dimethyl-6-carboxychroman-4-one; 2-(2'-hydroxy-5'-methoxy-phenyl)-N-(2''-methyl-propenyl)-2-oxo-acetamide; 4-(3'(*E*)-decenyl) phenol (**gibbilimbol B**); methyl 2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carboxylate. The component 2-(2'-hydroxy-5'-methoxy-phenyl)-N-(2''-methyl-propenyl)-2-oxo-acetamide is new as natural product. In order to help in identification of structure 4-(3'(*E*)-decenyl) phenol some reactions of derivatizations was done.

A circadian analysis of the volatile components from unripe fruits and ripe fruits of this plant, obtained by headspace and hydrodistillation, was performed by GC/MS. Field trials were done to verify the function of essential oils in the attraction of frugivorous bat *C. perspicillata*.

These trials were conducted with:

1) The essential oil of ripe fruits obtained by hydrodistillation. The result was an significant attractivity value (80,7 %).

2) The main component identified in the sample of the essential oil of ripe fruits collected in the night, synthetically obtained. It's not obtained a conclusive result.

Along with the phytochemical study, it was also made an antimicrobial activity assays. The substances 2,2-dimethyl-6-carboxychroman-4-one and 2-(2'-hydroxy-5'-methoxy-phenyl)-N-(2''-methyl-propenyl)-2-oxo-acetamide showed inhibitory activity for the microorganisms *Enterococcus faecium*, *Micrococcus luteus* and

Staphylococcus faecium, while the samples 4-(3'(E)-decenyl) phenol and 4-(3'(E)-decenyl) methoxybenzene showed a positive results only against *Rhodococcus equi*.

It's pioneering work because showed the mutualistic interaction between frugivorous bat and plant, considering the biological and **chemical aspects** these interaction.

Índice

	Páginas
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	ix
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ESQUEMAS	xviii
LISTA DE GRÁFICOS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
1 INTRODUÇÃO	1
Ecologia química	5
Piperaceae	7
2 OBJETIVOS	24
Objetivo Geral	24
Objetivos Específicos	24
3 METODOLOGIA	26
3.1 Métodos Gerais	27
3.2 Coleta do material vegetal	29
3.3 Metabólitos Secundários – compostos não voláteis	30
3.3.1 Extração	30
3.3.2 Purificação	31
3.3.2.1 E(CH ₂ Cl ₂) _{fi} – extrato diclorometânico dos frutos imaturos	31
3.3.2.2 E(CH ₂ Cl ₂) _{fm} – extrato diclorometânico dos frutos maduros	34
3.3.2.3 EE _{fi} – extrato etanólico dos frutos imaturos	34
3.3.2.4 EE _{fm} – extrato etanólico dos frutos maduros	34
Fluxograma 1	36

Fluxograma 2	37
Fluxograma 3	38
Fluxograma 4	39
Fluxograma 5	40
3.3.3 Identificação	41
3.3.4 Microderivatizações	41
3.3.4.1 Metilação com diazometano	41
3.3.4.2 Metilação com iodometano	41
3.3.4.3 Derivatização com dissulfeto de metila (DMDS)	41
3.3.4.4 Epoxidação	42
3.3.5 Testes biológicos	42
3.3.5.1 Microrganismos	42
3.3.5.2 Meios de cultura para manutenção dos microrganismos	43
3.3.5.3 Teste de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição (Eloff, 1998)	43
3.4 Metabólitos Secundários – compostos voláteis	44
3.4.1 Aeração A	44
3.4.2 Aeração B	44
3.4.3 Hidrodestilação	45
3.4.4 Síntese	46
3.4.5 Testes de campo	47
3.4.5.1 Captura em redes de neblina	47
3.4.5.2 Coleta de fezes	48
3.4.5.3 Identificação dos frutos consumidos	48
3.4.5.4 Identificação dos morcegos	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Metabólitos Secundários – compostos não voláteis	49
4.1.1 E(CH ₂ Cl ₂) _{fi} – extrato diclorometânico dos frutos imaturos	50
4.1.2 E(CH ₂ Cl ₂) _{fm} – extrato diclorometânico dos frutos maduros	64
4.1.3 EE _{fi} – extrato etanólico dos frutos imaturos	64
4.2 Testes Biológicos	66
4.3 Metabólitos Secundários – compostos voláteis	70

4.3.1 Metabólitos Secundários – compostos voláteis – Métodos de Obtenção do Óleo Essencial	70
4.3.1.1 Aeração A	71
4.3.1.2 Aeração B	71
Aeração	
Frutos Imaturos	72
Frutos Maduros	73
Frutos Imaturos e Maduros	74
Hidrodestilação	
Frutos Imaturos	75
Frutos Maduros	76
Frutos Imaturos e Maduros	77
Aeração e Hidrodestilação	78
4.3.2 Metabólitos Secundários – compostos voláteis – Testes de Campo	81
Experimento 1	83
Experimento 2	84
Experimento 3	85
Experimentos 1, 2 e 3	86
Experimento 4	87
5 CONCLUSÃO	90
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
7 ANEXOS A	98
8 ANEXOS B	111

Lista de Quadros

1	Substâncias encontradas em algumas espécies de <i>Piper</i>	08
2	Revisão bibliográfica de óleo essencial (28 espécies de <i>Piper</i>)	12

Lista de Tabelas

1	Principais componentes do óleo essencial de <i>Piper</i> – Revisão Bibliográfica	14
2	Extratos brutos de frutos imaturos e maduros de <i>P. gaudichaudianum</i>	31
3	Comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C dos átomos de carbono alílicos	59
4	Atividade antimicrobiana de substâncias isoladas de <i>P. gaudichaudianum</i> – MIC	68
5	Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas - Experimento 1	83
6	Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas - Experimento 2	84
7	Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas - Experimento 3	85
8	Espécies e porcentagens de todos os morcegos capturados nos experimentos 1, 2 e 3	86
9	Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas no experimento utilizando o éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodiólico	88
10	Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	99
11	Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	100

12	Valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e de ¹³ C da substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	101
13	Valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e de ¹³ C da substância (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B)	102
14	Valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e de ¹³ C da substância (E)-4-(3'-4'-epoxidecano) metoxibenzeno	103
15	Valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e de ¹³ C da substância 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metila	104
16	Componentes do óleo essencial de <i>P. gaudichaudianum</i> obtido via aeração	105
17	Componentes do óleo essencial de <i>P. gaudichaudianum</i> obtido via hidrodestilação	108

Lista de Figuras

1	Mapa de localização do Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PEVR) no município de Fênix - Paraná	04
2	Morcego <i>Carollia perspicillata</i> capturado no PEVR	07
3	<i>Piper gaudichaudianum</i> coletada no PEVR	11
4	Frutos de <i>P. gaudichaudianum</i> prestes a amadurecer protegidos com saco plástico, coletados no PEVR	29
5	Frutos de <i>P. gaudichaudianum</i> prestes a amadurecer protegidos com tecido, coletados no PEVR	30
6	Sistema de aeração utilizado no PEVR	45
7	Aparelho de Clevenger modificado utilizado para hidrodestilação em laboratório	46
8	Conformação preferencial do anel C da flavanona	51
9	“Fruto-isca” preso a rede de neblina	81
10	Redes de neblina dispostas em zigue-zague no PEVR	82
11	Morcego <i>Sturnira lilium</i> capturado em teste de campo – PEVR	82
12	Espectro de RMN ^1H da substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	112
13	Espectro de RMN ^{13}C da substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	112
14	Espectro de massas de alta resolução da substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	113
15	Espectro no infravermelho da substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	113
16	Espectro no ultravioleta da substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	114
17	Espectro de RMN ^1H da substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	115
18	Espectro de RMN ^{13}C da substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	115

19	Espectro de massas de alta resolução da substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	116
20	Espectro no infravermelho da substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	116
21	Espectro no ultravioleta da substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	117
22	Espectro de RMN ^1H da substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	118
23	Espectro de RMN ^{13}C da substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	118
24	Espectro de massas de alta resolução da substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	119
25	Espectro no infravermelho da substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	119
26	Espectro no ultravioleta da substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	120
27	Espectro de RMN ^1H da substância (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B)	121
28	Espectro de RMN ^{13}C da substância (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B)	121
29	Espectro de massas de alta resolução da substância (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B)	122
30	Espectro no infravermelho da substância (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B)	122
31	Espectro no ultravioleta da substância (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B)	123
32	Espectro de massas da substância (E)-4-(3'-decenil) metoxibenzeno	124
33	Espectro de massas da substância (E)-4-(3'-decenil) metoxibenzeno em reação com DMDS	125
34	Espectro de RMN ^1H da substância (E)-4-(3'-4'-epoxidecano) metoxibenzeno	126

35	Espectro de RMN ^{13}C da substância (E)-4-(3'-4'-epoxidecano) metoxibenzeno	126
36	Espectro de RMN ^1H da substância 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metila	127
37	Espectro de RMN ^{13}C da substância 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metila	127
38	Espectro no ultravioleta da substância 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metila	128
39	Cromatograma FI_m – Aeração	129
40	Cromatograma FI_t - Aeração	130
41	Cromatograma FI_n - Aeração	131
42	Cromatograma FM_m - Aeração	132
43	Cromatograma FM_t - Aeração	133
44	Cromatograma FM_n - Aeração	134
45	Cromatograma FI_m – Hidrodestilação	135
46	Cromatograma FI_t – Hidrodestilação	136
47	Cromatograma FI_n – Hidrodestilação	137
48	Cromatograma FM_m – Hidrodestilação	138
49	Cromatograma FM_t – Hidrodestilação	139
50	Cromatograma FM_n – Hidrodestilação	140

Lista de Esquemas

1	Disposição das redes de neblina na trilha do PEVR	47
2	Proposta de fragmentação de massas para a substância 5,7-diidroxi flavanona (pinocembrina)	53
3	Proposta de fragmentação de massas para a substância 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona	55
4	Proposta de fragmentação de massas para a substância 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida	57
5	Proposta de fragmentação de massas para as substâncias (E)-4-(3'-decenil) fenol (gibbilimbol B) e (E)-4-(3'-decenil) metoxibenzeno	60
6	Proposta de fragmentação de massas para a substância (E)-4-(3'-decenil) metoxibenzeno , após derivatização com DMDS	61
7	Epoxidação com o perácido <i>m</i> -CPBA	62

Lista de Gráficos

1	Representação dos óleos essenciais dos FI obtidos via aeração	72
2	Representação dos óleos essenciais dos FM obtidos via aeração	73
3	Comparação dos óleos essenciais dos FI e FM obtidos via aeração	74
4	Representação dos óleos essenciais dos FI obtidos via hidrodestilação	76
5	Representação dos óleos essenciais dos FM obtidos via hidrodestilação	77
6	Comparação dos óleos essenciais dos FI e FM obtidos via hidrodestilação	78
7	Comparação dos óleos essenciais obtidos via aeração e hidrodestilação	79

Lista de Abreviaturas

CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY	Espectro bidimensional de correlação homonuclear (H x H) a três ligações
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DEPT	Espectro de RMN ^{13}C utilizando transferência de polarização
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DMAP	4-(dimetilamino) piridina
DMDS	Dissulfeto de metila
EM	Espectro de massas
E(CH₂Cl₂)_{fi}	Extrato diclorometânico dos frutos imaturos
E(CH₂Cl₂)_{fm}	Extrato diclorometânico dos frutos maduros
EE_{fi}	Extrato etanólico dos frutos imaturos
EE_{fm}	Extrato etanólico dos frutos maduros
FI	Frutos Imaturos
FI_m	Frutos imaturos manhã
FI_t	Frutos imaturos tarde
FI_n	Frutos imaturos noite
FM	Frutos maduros
FM_m	Frutos maduros manhã
FM_t	Frutos maduros tarde
FM_n	Frutos maduros noite
HETCOR	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C x H) a uma ligação
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
<i>m</i>-CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico

m/z	Relação massa/carga
m	Múltiplo
MIC	Concentração mínima inibitória
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PEVR	Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo
ppm	Partes por milhão
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
t	Tripleto
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
UV	Ultravioleta

1

Introdução

A destruição dos ecossistemas florestais é um dos principais problemas ambientais do mundo moderno. Há estimativas de que a cada dia no mundo, 46 mil ha de florestas são destruídos (Silva, 2001). Dados da Organização de Alimento e de Agricultura das Nações Unidas (FAO) estimam em torno de 0,4% ao ano as taxas de desmatamento no Brasil (Whitmore, 1990). Dados mais recentes, fornecidos pelo INPE, revelam que a média da devastação anual entre 1978-1988 no Brasil foi de 20 mil ha e entre 1988-1997 da ordem de 15 mil, resultando no desmatamento de 11% da Floresta Amazônica (Zaú, 1998). A Mata Atlântica e seus ecossistemas associados envolviam, originalmente, área de 1.360.000 km², distribuídos por 17 estados e aproximadamente 50% dos municípios brasileiros. Atualmente o bioma está reduzido a fragmentos dispostos de modo esparsa ao longo da costa brasileira e no interior do país, que representam menos de 8% de sua extensão original (MMA 2000).

As florestas tropicais, embora ocupem apenas 7% da superfície da Terra, provavelmente sustentam mais da metade da vida do planeta (Laurance et al., 1997). O Brasil é o principal país entre aqueles detentores de megadiversidade, possuindo de 15 a 20% do número total de espécies da Terra. Em conjunto, os mamíferos, aves, répteis e anfíbios que ocorrem na Mata Atlântica, somam 1807 espécies, sendo 389 endêmicas. Isto significa que a Mata Atlântica abriga, aproximadamente, 7% das espécies conhecidas no mundo nesses grupos de vertebrados. Nesse cenário de riqueza e endemismo observa-se, por outro lado, elevado número de espécies ameaçadas de extinção (MMA, 2000), já que a fragmentação, processo no qual grandes blocos de hábitat são quebrados em blocos pequenos e isolados, é uma das maiores ameaças à biodiversidade (Wilcox et al., 1985; Wilcove et al., 1986, Laurance et al., 1997).

As alterações dos ambientes naturais em nosso país, especialmente no século passado, foram muito intensas, degradando áreas riquíssimas em

biodiversidade. A ameaça da falta de água, o envenenamento do meio ambiente, a redução a limites críticos de nossos remanescentes naturais, a extinção da flora e da fauna não são mais uma previsão para um futuro remoto. Se os problemas ainda não se apresentam em maiores dimensões, é porque a natureza tem tido a capacidade de resistir mais do que o previsto (Borges, 2002).

A manutenção e a recuperação destes ecossistemas é tema de interesse global, pois os prejuízos advindos da degradação das florestas atingem a todos os seres vivos, inclusive o homem. O impacto da degradação é percebido por meio do aumento da concentração de gás carbônico na atmosfera, da erosão e perda de solo fértil para a agricultura, da redução da disponibilidade e da qualidade da água, do assoreamento e poluição de corpos d'água, da perda incalculável de diversidade biológica – fonte ainda pouca explorada de produtos, organismos e genes, e da perda de um grande potencial ecoturístico (Lazarini et al., 2001).

Áreas que perderam a cobertura florestal há mais tempo, mas que estão próximas a fragmentos de florestas ou reservas maiores, podem ter seu banco de sementes reabastecido pelas sementes provenientes de refúgios vizinhos, pela denominada chuva de sementes. Elas podem ser trazidas pelo vento, por **animais**, ou outras formas de dispersão. Áreas com essas características podem regenerar-se naturalmente se não estiverem muito perturbadas e forem protegidas contra a ação do fogo e predação por animais, como bovinos. Após a proteção dessas áreas, geralmente promovida pela colocação de cercas, a regeneração natural inicia-se rapidamente. Em alguns anos, novas árvores surgem. Porém, serão necessárias décadas para que a nova vegetação tenha a aparência da floresta original. Este é o método mais barato de restauração florestal, mas por outro lado é o mais lento. Neste método é preciso considerar também que, dependendo da situação do banco de sementes e da distância da fonte de propágulos mais próxima, o processo pode estar comprometido (Ferreti, 2002).

Ainda segundo Ferreti (2002), alguns artifícios podem ser utilizados para acelerar a regeneração natural. Entre eles está a instalação de poleiros para aves, como postes, palanques de cerca, galhos de árvores, bambus e mudas de árvores. As aves, ao pousarem para descansar, marcar território ou buscar alimento, podem deixar cair sementes que transportam no bico, no papo ou no trato digestivo.

Diversas evidências sugerem que os morcegos e as aves de pequeno porte possuem um papel importante na recomposição de ambientes através da dispersão de plantas pioneiras (Fleming, 1988). Porém, os morcegos destacam-se devido ao seu comportamento de defecar em voo e deslocar-se em áreas mais abertas, criando uma chuva de sementes diferenciadas (Thomas et al., 1988) e possibilitando a regeneração de clareiras naturais e de áreas desmatadas (Muller et al., 1992, Gorchow et al., 1993). Algumas espécies de morcegos frugívoros, como *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Sturnira lilium*, exercem um papel importante na dispersão de plantas pioneiras dos gêneros *Cecropia*, *Piper*, *Solanum* e *Ficus* (Charles-Dominique, 1986, Fleming, 1986, Mikich, 2002). Porém, segundo Howe, (1984) o papel dos morcegos na recomposição de ecossistemas tropicais tem recebido pouca atenção, apesar de existirem claras evidências de sua importância como dispersores de sementes, como por exemplo, na regeneração de trechos da floresta amazônica (Gorchow et al., 1993) e na recomposição da vegetação da ilha Krakatau -Indonésia, destruída por uma erupção vulcânica (Whittaker et al., 1994). O morcego frugívoro *C. perspicillata* (Phyllostomidae) é, sozinho, um importante agente dispersor para pelo menos 25 espécies de plantas em Trinidad (Heithaus et al., 1978). A distribuição das sementes destas plantas é grandemente determinada pela movimentação dos morcegos em busca de alimento. Segundo o MMA (2000), os inventários biológicos e a implantação de corredores – utilizando a matriz da paisagem como complemento essencial para assegurar a proteção da biodiversidade – estão entre as ações prioritárias para a conservação da Mata Atlântica, já que menos de 2% do que resta deste bioma encontra-se dedicado a este objetivo.

Das 80 áreas indicadas pelo MMA (2000) como prioritárias para ações de conservação na Mata Atlântica, 14 tiveram propostas para o estabelecimento de corredores ecológicos e manejo de áreas entre as unidades de conservação, entre elas está o **Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PEVR)**, onde se desenvolveu este trabalho. Localizado em Fênix, PR (23° 54'S – 51° 56'W), no Terceiro Planalto Paranaense, possui 354 ha cercados por terras cultivadas e pelos rios Ivaí e Corumbataí (figura 1). O clima é do tipo Cfa ou subtropical úmido mesotérmico com verões quentes e geadas pouco freqüentes. A precipitação anual fica em torno de 1500 mm com concentração de chuvas nos meses de verão

(dezembro a fevereiro) (ITCF, 1987). A vegetação é do tipo Floresta Estacional Semidecidual, na sua maior parte representada por floresta secundária com mais de 370 anos e pequenas porções em estágio intermediário de sucessão (mais de 10 anos) onde existem vários elementos cultivados. Piperaceae é uma das principais famílias presentes no PEVR, onde está representada por sete espécies: *Piper amalago*, *P. hispidum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. arboreum*, *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum*, sendo esta última a mais abundante (Plano de Manejo, 1987).

A importância desse Parque para o nosso trabalho está no fato de que, além de possuir a espécie *P. gaudichaudianum* em abundância, tem em sua fauna os morcegos frugívoros *Carollia perspicillata*, permitindo dessa forma, não só a coleta do material vegetal, mas também o estudo da interação planta-morcego.

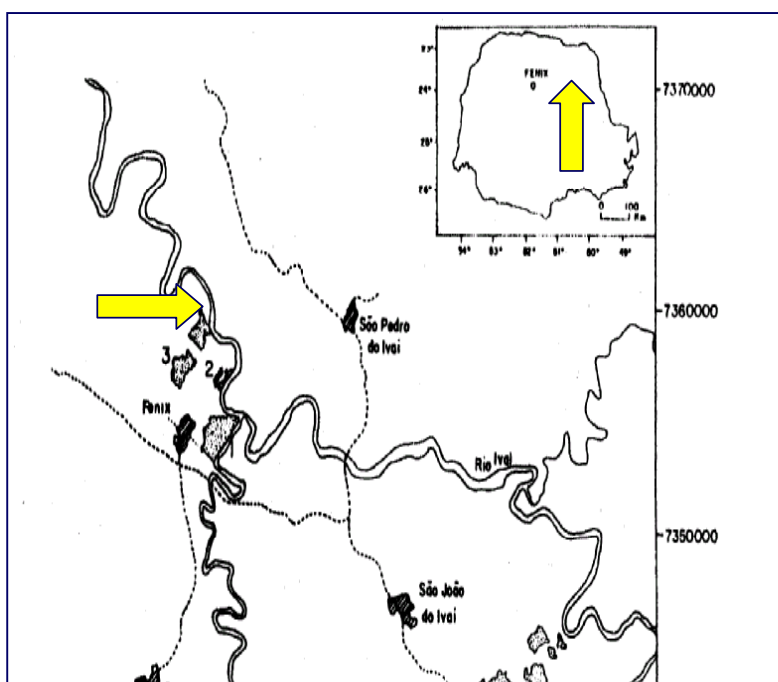


Figura 1. Mapa de localização do Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PEVR) no município de Fênix - Paraná

Ecologia Química

Ecologia química é uma área que tem se destacado muito ultimamente, envolvendo interações animal-animal, planta-planta e planta-animal.

É do interesse deste trabalho, os **sinomônios**, sinais químicos presentes na comunicação planta-morcego frugívoro, que beneficia ambas as espécies envolvidas. Segundo Grison-Pigé (2002), análises químicas do óleo essencial de três espécies tropicais de *Ficus* associadas a testes com insetos polinizadores (vespas) dessas espécies, mostraram o papel do sinal químico como estimulante do polinizador, bem como a especificidade do estímulo.

Aproximadamente 250 espécies de morcegos da família Phyllostomidae, no Novo Mundo, e Pteropodidae, no Velho Mundo, dependem parcial ou totalmente de plantas como fonte de alimento. Além disso, centenas de plantas, muitas delas com importância comercial, usam estes morcegos como polinizadores e dispersores de sementes (Fleming, 1988). Estima-se que os morcegos polinizem pelo menos 500 espécies de plantas neotropicais em 96 gêneros (Vogel, 1969).

Interações ecológicas entre plantas e animais, seus polinizadores / dispersores, são mutualísticas. Os animais obtêm uma fonte nutricional (néctar, pólen ou polpa de frutos e, ocasionalmente sementes) das plantas que, em contrapartida, ganham mobilidade para seus grãos de pólen e sementes. Mas as plantas são mais sensíveis à ação dos animais do que vice-versa, pois elas têm mais a ganhar (via aumento do sucesso reprodutivo) sendo mais seletivas em seus visitantes do que os animais em sua escolha de alimento (Fleming, 1988). Se eficientes polinizadores e dispersores de sementes são limitados, então as plantas competirão intra e inter-especificamente por visitantes mais efetivos e tenderão a atrair diferentes sub-grupos de visitantes (Fleming, 1988).

A coevolução polinizadores / frugívoros-plantas tem resultado em especializações morfológicas das plantas restringindo os animais visitantes. Estas especializações estratégicas têm influenciado fortemente a evolução do tamanho da semente, que por sua vez, tem influenciado a coevolução de frutos e frugívoros. Por exemplo, o tamanho da semente influencia sua mobilidade, tamanho e características nutricionais do fruto e a variedade de agentes dispersores. Mas, a acessibilidade e o tamanho do fruto não são fatores muito importantes na escolha do

alimento pelos morcegos frugívoros da família Phyllostomidae, que são ágeis voadores e, que se, devido ao tamanho do fruto não puderem carregá-lo, alimentar-se-ão de pedaços da polpa. A disposição espaço-temporal e as características nutricionais dos frutos são os fatores que provavelmente determinam a dieta desses morcegos (Fleming, 1986).

Sabe-se há muito tempo que morcegos simpátricos alimentam-se de frutos de plantas de diferentes gêneros e famílias. Entretanto, explicações para esse comportamento não são ainda completas e satisfatórias.

Não é claro por exemplo, porque morcegos de Monteverde (Costa Rica), não incluem Lauraceae em sua dieta. Dinerstein (1983) relata ter fornecido frutos de Lauraceae para morcegos *Sturnira* e *Artibeus* em cativeiro, e estes “cuspiram”, expeliram a polpa. Em outro estudo, (Fleming, 1986), polpas de frutos de *Trichilia cuneata*, *Ocotea veraguensis* e *Byrsonima crassifolia* foram fornecidas para morcegos *C. perspicillata* em cativeiro, e o resultado observado foi o mesmo. Jansen (1978) sugere que a presença de metabólitos secundários em certos tipos de frutos repelem efetivamente certos tipos de frugívoros.

Os morcegos da família Phyllostomidae, entre eles *C. perspicillata* têm visão limitada, sem percepção de cores, possuem o olfato apurado e sonar pouco desenvolvido. Segundo Koay (2003), este morcego é um ágil voador, alimenta-se solitariamente e em áreas relativamente densas, onde fica menos exposto a predadores. Utiliza o olfato para detecção e localização do fruto maduro, em seguida então, utiliza-se da ecolocalização para a aproximação final ao fruto. A visão aparentemente não tem papel relevante no processo de busca do alimento. Isto sugere que a atração pela planta pode ser mais olfativa do que visual, levando em consideração também, que o morcego é um animal noturno (Bizerril et al., 1997). Presume-se que a acuidade olfatória é alta nas famílias Phyllostomidae e Pteropodidae, mas esta suposição é baseada apenas em estudos anatômicos e observações de campo (Fleming, 1988).

O morcego *Carollia perspicillata* (figura 2), objeto de estudo da relação planta-morcego deste trabalho, é uma espécie de ampla distribuição, ocorrendo em praticamente toda a América do Sul e Central. Possui aproximadamente 20 g de peso e alimenta-se de frutos e insetos. É uma das espécies mais comuns nas florestas de planície e em habitats perturbados. Ocupa o estrato inferior onde

consome frutos de arbustos e arvoretas, principalmente do gênero *Piper*. Piperaceae se constitui em um importante recurso alimentar para esse quiróptero, seus frutos correspondem a aproximadamente 70% de sua dieta (Mikich, 2002). Os morcegos podem perceber as características dos frutos *Piper* por ecolocalização (forma, estrutura da superfície), olfação (aroma) e, dentro de condições favoráveis, visão (Thies, 1998).

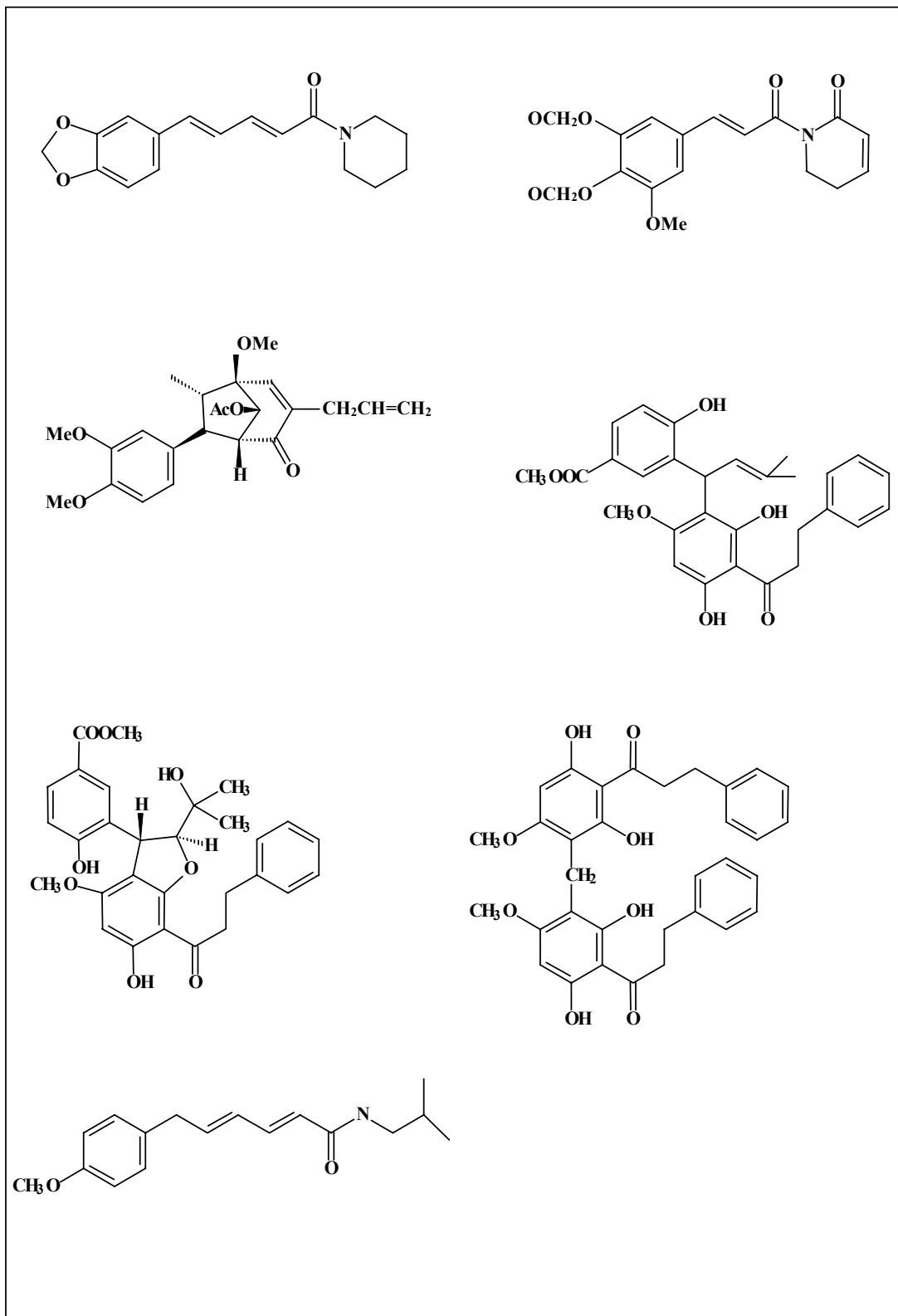


Figura 2. Morcego *Carollia perspicillata* capturado no PEVR

Piperaceae

A família Piperaceae tem larga distribuição no mundo e é composta por 10 gêneros, possuindo em torno de 2300 espécies. No Brasil esta família está representada por cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis*. Os maiores gêneros são *Piper* e *Peperomia*, os quais são também os mais estudados quimicamente. É uma família largamente utilizada na medicina popular, de grande diversidade estrutural em relação aos seus constituintes químicos. As classes de compostos mais encontradas são alcalóides, neolignanais, lignanas, flavonóides e isobutilamidas (Parmar, 1997).

Exemplos destas substâncias estão no quadro 1.

Quadro 1: Substâncias encontradas em algumas espécies de *Piper*

O gênero *Piper* tem cerca de 700 espécies distribuídas em ambos os hemisférios. A maioria dos estudos com este gênero são feitos na área medicinal, do qual já foram isoladas diversas substâncias com propriedades farmacológicas. Sabe-se que a bioatividade de espécies de *Piper* pode geralmente ser atribuída à presença de lignanas e ou amidas, como isobutilamidas alquílicas ou olefínicas (Ahn et al., 1992). O gênero *Piper* é freqüentemente um elemento dominante dentro da floresta tropical e se constitui num dos cinco gêneros mais importantes na seleta floresta Neotropical. Não surpreendentemente, as espécies *Piper* têm grande importância ecológica e são consideradas espécies “chave”, com base em suas associações com morcegos frugívoros (Jaramillo et al., 2001).

Em todo o mundo, as espécies de Piperaceae são tradicionalmente utilizadas também como pesticidas. As espécies indianas *P. longum*, *P. betle*, *P. peepuloides* e *P. cubeba* apresentam atividade contra mosquitos e moscas. Pouco se sabe sobre os compostos responsáveis por essa atividade inseticida. Contudo, sabe-se que as amidas, freqüentemente encontradas em Piperaceae, são tóxicas para moscas de frutas, baratas e várias outras espécies de insetos. Elas atuam como neurotoxinas. Fenilpropanóides se constituem em outro grupo de compostos potencialmente ativos presentes em *Piper*. A toxicidade dessas substâncias, com poucas exceções, como o safrol, que tem sido utilizado como inseticida natural, não foi estabelecida (Bernard et al., 1995).

Algumas plantas produzem frutos carnosos para atrair frugívoros que possam dispersar suas sementes adequadamente (Mc Key 1975, Gauntier-Hion et al., 1985). Os frutos maduros de Piperaceae são também uma importante fonte de alimento para morcegos: “morcegos *Phyllostomidae* são os mais importantes consumidores de frutos *Piper*” (Heithaus et al., 1975) e, em particular, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina* são espécies que demonstram distinta preferência por estes frutos (Charles-Dominique, 1991; Fleming, 1981; Fleming et al., 1977; Marinho-Filho, 1991; Palmeirim et al., 1989). Essa preferência foi verificada com base na coleta e análise das fezes de morcegos dessas espécies, capturados em redes de neblina. Poucos autores têm estudado em detalhes, aspectos químicos dessa especialização (Bizerril et al., 1997).

Plantas do gênero *Piper* são arbustos ou arvoretas comuns e conspícuas do subosque de muitas florestas neotropicais (Fleming, 1985). Por serem espécies

pioneiras, são particularmente comuns em áreas perturbadas, em bordas de floresta e em clareiras produzidas pela queda de árvores (Thies *et al.*, 1998). Seus frutos apresentam um conjunto de características associadas com dispersão por morcegos. São ditos frutos quiropterocóricos e apresentam as seguintes síndromes: 1) porção comestível, macia ou dura; 2) dimensões do fruto e semente variáveis; 3) coloração discreta, geralmente verde, amarelada, branquicenta ou marrom; 4) odor de fermentação ou almíscar; 5) ligação permanente à planta-mãe mesmo após a maturação; 6) pericarpo duro, com indeiscência possível; 7) exposição na parte externa da planta para facilitar a apreensão em voo (Mikich, 2002). Frutos maduros de *Piper*, consumidos por *C. perspicillata* são ricos em proteína e apresentam baixo teor de fibras, e estão disponíveis em baixo número por planta, por noite. Isto faz com que seu consumidor necessite visitar de 2 a 6 locais separados de Floresta Tropical por noite, a fim de obter a quantidade de energia suficiente para sua sobrevivência (Fleming, 1986). Estes frutos permanecem esverdeados quando maduros, mas ao contrário dos imaturos são moles, exalam odor característico e são rapidamente consumidos pelos morcegos (Fleming, 1981; Thies *et al.*, 1998). Para um humano é difícil distinguir visualmente um fruto imaturo de um maduro, já o morcego o faz facilmente. As espécies do gênero *Piper* frutificam seqüencialmente durante o ano. A espécie em estudo, *P. gaudichaudianum* (figura 3) é encontrada em abundância no PEVR, principalmente ao longo de trilhas e estradas. Esta espécie apresenta dois picos de frutificação, um nos meses de novembro/fevereiro e outro de menor intensidade em maio/julho (Mikich, 2001b).



Figura 3. *Piper gaudichaudianum* coletada no PEVR

Óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis que as plantas produzem para suas necessidades não nutricionais (com fins de proteção ou de atratividade). Em geral são misturas complexas de compostos orgânicos que dão características odoríferas e de sabor para as plantas (Kéïta et al., 2000).

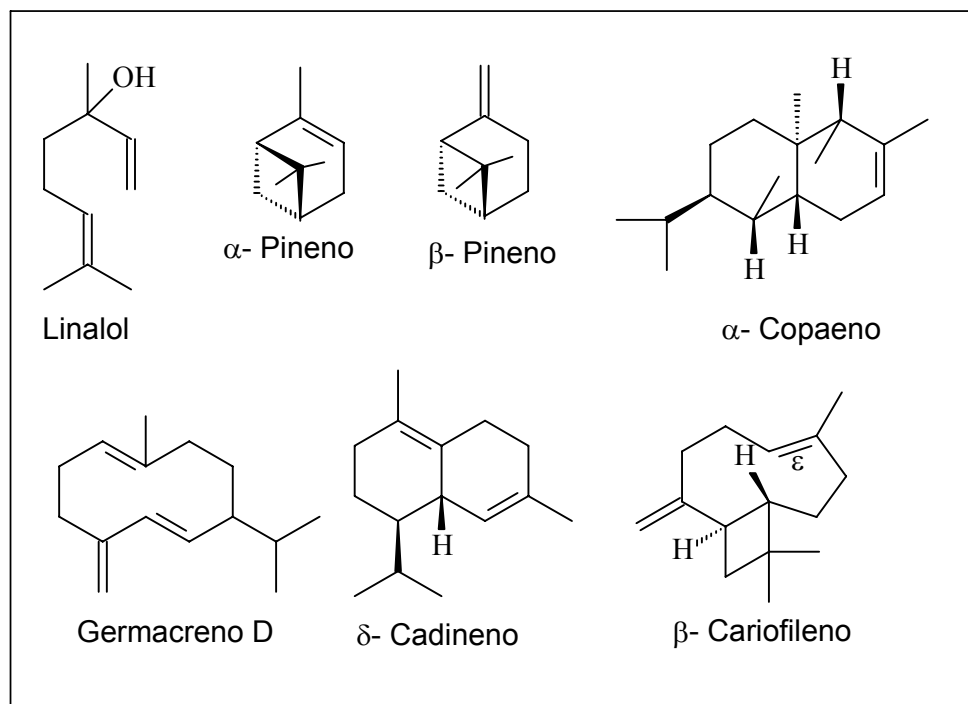
Análises dos constituintes voláteis de espécies de Piperaceae revelaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides (apiol, dilapiol, miristicina, safrol, sarisan), apresentando interessantes propriedades biológicas (Santos et al., 2001).

Vários trabalhos de análise química de óleo essencial de Piperaceae são encontrados na literatura. A grande maioria obtidos via hidrodestilação e utilizando as partes aéreas da planta. Resultado de uma revisão bibliográfica apresentada na tabela 1, pág. 14, estão sendo mostrados os componentes identificados nos óleos essenciais de 28 espécies de *Piper*, em concentração igual ou superior a 2%. Os componentes identificados como principais, presentes em praticamente todas as espécies analisadas e em concentrações significativas, estão sendo mostrados no quadro 2, pág. 12.

A composição química do óleo essencial de plantas tem sido freqüentemente estudada, mas o papel desses odores na atração de polinizadores têm sido raramente testados.

Este trabalho propõe pela primeira vez, a análise química do óleo essencial de uma espécie de frutos *Piper*, obtido por meio de duas técnicas, aeração e hidrodestilação, verificando seu papel na atração de morcegos frugívoros.

Quadro 2: Revisão bibliográfica de óleo essencial (28 espécies de *Piper*) – **Principais componentes:** identificados em concentrações significativas em praticamente todas as espécies analisadas



De uma maneira geral, estudos de ecologia química de Piperaceae são raramente encontrados. Alguns relatos mostram a interação de *Piper* com formigas (Harborne, 1993). Outros estudos tratam da interação com morcegos. Thies (1998), relata um experimento em que morcegos *Carollia perspicillata* e *Carollia castanea*, ao baterem as asas emitem sinais multi-harmônicos de frequência modulada, de curta duração, baixa intensidade e de banda larga. Foram discriminadas duas fases nesse comportamento de ecolocalização do morcego. A fase de orientação, de procura do fruto maduro (um pulso simples por batida de asa) e a fase de aproximação, seguida da remoção do fruto.

O retorno de vários sinais de eco, não só dos frutos maduros localizados, mas também de folhas e galhos, fazem com que o morcego precise de outras fontes de informação em sua busca por alimento.

Ainda neste relato de Thies (1998), experimentos foram conduzidos utilizando frutos artificiais cujo odor, estrutura da superfície e/ou forma foram manipulados, revelando que forma e principalmente odor têm papel relevante na localização do fruto maduro. Para muitas espécies de Phyllostomidae, a importância da utilização da ecolocalização e de outros recursos sensoriais como visão e olfato, no processo de forrageamento não estão ainda bem determinados (Thies, 1998), e os trabalhos apresentados não consideram o entendimento do aspecto químico da interação planta - morcego frugívoro.

Em função de todas essas informações alguns questionamentos são formulados.

Ao apresentar preferência por determinado fruto, o morcego busca o conteúdo nutricional presente no fruto?

Frutos de espécies não consumidas por determinada espécie de morcego, apresentam metabólitos secundários com função repelente para esses morcegos?

Uma vez que morcegos frugívoros apresentam o olfato bem desenvolvido, eles são atraídos até os frutos maduros, via óleos essenciais?

Na busca por respostas satisfatórias a essas questões, procurou-se aliar o aspecto biológico (presente em vários relatos da literatura) ao aspecto químico (**ênfoque inédito deste trabalho**) dessa interação mutualística, entendendo que a compreensão dessa inter-relação poderá se constituir em uma ferramenta valiosa na recuperação de áreas degradadas.

[illegible]

Componente	IR	Pca	Pni	Pum	Par	Pfi	Pla folha	Pla fruto	Pob	Pfu	Pma folha	Pma galho	Pso	Pgo	Pdi
β -Cariofileno	1418	12,6%	15,1%	9,8%	4,4%/6,4%	11,3%	20,6%	5,1%	27,6%	3,7%	4,0%	5,6%		13,3%	2,2%
α -trans-bergamoteno	1436														
Aromadendreno	1439									4,2%					
Z- β -Farneseno	1443														
γ -Elemeno	1453										3,7%				
α -Humuleno	1454								2,3%						
9- <i>epi</i> -Cariofileno	1467														2,1%
γ -Gurjuneno	1473														
Sarisan													39,2%		
γ -Muuroleno	1477	2,1%								3,3%					
Alloaromadendreno	1479														
Germacreno D	1480	3,3%			5,3%/3,6%	12,8%	12,5%	3,2%	3,9%					28,9%	
γ -Curcumeno	1480														
Guaieno	1490														
2-Tridecanone	1492														4,4%
<i>epi</i> -Cubebol	1493														
Biciclogermacreno	1494					2,7%									
α -Muuroleno	1499				4,2%										
Germacreno A	1503				3,3%										
β -Selineno	1506					2,1%									
<i>E-E</i> - α -Farneseno	1508													14,1	
β -Bisaboleno	1509								4,5%						
γ -Cadineno	1513													2,2%	
δ -Cadineno	1524				25,8%	2,6%				2,4%				3,7%	
<i>cis</i> -Nerolidol	1534														
Elemol	1549				2,6%										
Elemicina	1554						24,4%	16,4%							
Germacreno-B	1556												3,5%	2,4%	
<i>E</i> -Nerolidol	1564	3,2%		12,4%						3,1%				2,6%	
Espatuleno	1576					2,9%			10,6%	5,4%			2,9%		
Óxido de cariofileno	1581								8,3%						

Componente	IR	Pca	Pni	Pum	Par	Pfi	Pla folha	Pla fruto	Pob	Pfu	Pma folha	Pma galho	Pso	Pgo	Pdi
3,4-Metilenodioxipropiofenona											8,0%	8,9%			
Álcool sesquiterpênico															

Componentes		Pad folha	Pad fruto	Phi	Pho	Pgu	Pba	Pam	Pan	Pmo	Plh	Pbe	Pau	Pce	Pre
Piperitona	252	11,1%/2,2%	13,5%/5,1%												
α -Pino	942	2,0%	2,9%					16,8%	4,8%					7,2%	
Canfeno	957								22,4%						
Sabineno	976														
β -Pino	980													6,1%	
Mirceno	991														52,6%
α -Felandreno	1005		2,6%			8,2%									
δ -3-Careno	1011						2,2%								
α -Terpineno	1018		2,0%												
Limoneno	1028					2,6%		3,5%	2,5%						4,1%
β -Felandreno	1031					5,9%									
1,8-Cineol	1033	5,8%	8,6%												
Z- β -Ocimeno	1040														
Trans- β -Ocimeno	1050	2,8%													
γ -Terpineno	1062	2,1%	3,7%												
Terpinoleno	1088														
Linalol	1093		2,5%			3,4%			2,1%						15,9%
Acetato de linalil															
Cânfora	1132								25,3%						
Iso-Borneol	1154								12,8%						
Borneol	1166														
4-Terpineol	1177	4,4%	5,4%												
Chavicol	1253											47,8%			

Componentes	Pad folha	Pad fruto	Phi	Pho	Pgu	Pba	Pam	Pan	Pmo	Plh	Pbe	Pau	Pce	Pre
Ishwarane														
Acetato de chavibetil											14,6%			
Diacetato de alilpirocatequil											3,5%			
Limoneno + β - Felandreno	2,4%	5,4%												
3,4- Metilenodioxipropio- fenona														
Álcool sesquiterpênico	6,4%													

Componentes		Pni folha	Pni galho	Pmi	Pos	Pte
Piperitona	252				12,9%	
α -Pineno	942	21,7%	19,3%		2,5%	6,7%
Canfeno	957				6,1%	
Sabineno	976	16,5%	7,2%			
β -Pineno	980	3,5%	4,9%			3,5%
Mirceno	991	2,0%				
α -Felandreno	1005		2,6%			
δ -3-Careno	1011					
α - Terpineno	1018		12,7%			
Limoneno	1028		7,9%		3,9%	
β -Felandreno	1031	2,9%				
1,8-Cineol	1033					
Z- β -Ocimeno	1040					
<i>Trans</i> - β -Ocimeno	1050					
γ - Terpineno	1062					
Terpinoleno	1088					
Linalol	1093			2,2%		
Acetato de linalil						

Componentes		Pni folha	Pni galho	Pmi	Pos	Pte
Cânfora	1132				8,3%	
Iso-Borneol	1154					
Borneol	1166					
4-Terpineol	1177		2,6%			
Chavicol	1253					
Timol	1272					
Safrol	1285			82,0%		
δ -Elemeno	1339					
α -Acetato de terpinil	1350					
α -Copaeno	1376					2,8%
β -Elemeno	1391	7,0%	2,3%			3,3%
Z-Cariofileno	1404					
β -Cariofileno	1418	3,3%	19,5%		6,7%	24,3%
α -trans-bergamoteno	1436					
Aromadendreno	1439					
Z- β -Farneseno	1443					
γ -Elemeno	1453					3,6%
α -Humuleno	1454	2,3%			2,8%	14,1%
9- <i>epi</i> -Cariofileno	1467					
γ -Gurjuneno	1473					
Sarisan						
γ -Muuroleno	1477					
Alloaromadendreno	1479					
Germacreno D	1480				8,2%	16,8%
γ -Curcumeno	1480					
Guaieno	1490	2,3%				
2-Tridecanone	1492					
<i>epi</i> -Cubebol	1493				2,2%	
Biciclogermacreno	1494					
α -Muuroleno	1499					
Germacreno A	1503					
β -Selineno	1506					
<i>E-E</i> - α -Farneseno	1508					

Componentes		Pni folha	Pin galho	Pmi	Pos	Pte
β -Bisaboleno	1509					
γ -Cadineno	1513					
δ -Cadineno	1524				4,1%	2,1%
<i>cis</i> -Nerolidol	1534					6,4%
Elemol	1549					
Elemicina	1554					
Germacreno-B	1556					
<i>E</i> -Nerolidol	1564					
Espatulenol	1576					
Óxido de cariofileno	1581					
Globulol	1583	49,7%	12,6%			
<i>epi</i> -Globulol						
Carotol	1594					
Guaiol	1595					
Miristicina	1606					
Epóxido de humuleno II	1606					
10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1619					
Dilapiol	1622		32,9/6 1,2%			
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627				6,2%	
γ -Eudesmol	1630					
Hinesol	1641					
Cubenol	1642				2,4%	
β -Eudesmol	1649					
α -Eudesmol	1652					
α -Cadinol	1653					
Bulnesol	1664					
β -Bisabolol	1668					
<i>E-E</i> -Farnesol	1722					
Éster etil do ácido benzenopropanóico						
Furanodieno						
Alilpirocatecshol						

Componentes	Pad folha	Pad fruto	Pmi	Pos	Pte
Chavibetol					
Parsley apiol					
1,5-epoxisalvial- 4(14)-eno					
Ishwarane					
Acetato de chavibetil					
Diacetato de alilpirocatequil					
Limoneno + β - Felandreno	2,4%	5,4%			
3,4- Metilenodioxipropiof enona					
Álcool	6,4%				
sesquiterpênico					

Legendas e referências:

Pca – *P. capense*; **Pni** – *P. nigrum*; **Pum** – *P. umbellatum* e **Pgu** – *P. guineense* – Martins, 1998; **Pam** – *P. amplum*; **Pdi** – *P. dilatatum*; **Pgo** – *P. goesii*; **Phi** – *P. hispidum*; **Pho** – *P. hoffmanseggianum* e **Pmo** – *P. mollicomum* – Santos, 2001; **Plh** – *P. lhotzkyanum* – Moreira, 1998; **Pce** – *P. cernuum* e **Pre** – *P. regnellii* – Constantin, 2001; **Pma** – folha e galho – *P. marginatum* – Ramos, 1986; **Pan** – *P. angustifolium* – Tirillini, 1996; **Pbe** – *P. betle* L. – Garg, 1996; **Pad** – folha e fruto – *P. aduncum* – Ciccio, 1997; **Pfi** – *P. fimbriulatum* e **Pob** – *P. obliquum* – Mundina, 1998 **Par** – *P. arboreum* – Santos, 2001 e Mundina, 1998; **Pau** – *P. auritum* – Gupta, 1985; **Pla** – folha e fruto – *P. lanceaefolium* – Mundina, 2001; **Pso** – *P. solmsianum* – Moreira, 1998 e Moreira, 2001 **Pfu** – *P. fulvescens* – Vila, 2001; **Pba** – *P. barbatum* – Vargas, 2003; **Pni** – *P. nigrum* – Pino, 2003; **Pmi** – *P. mikanianum* – Abreu, 2002; **Pos** – *P. ossanum* – Pino, 2002; **Pte** – *P. terrabanum* – Ciccio, 1996

2

Objetivos

Objetivo Geral

- Buscar a compreensão do aspecto químico da relação entre planta e morcego frugívoro, entendendo que o morcego poderá atuar como disseminador de sementes nos “corredores” entre os fragmentos de florestas nativas, uma vez, que é capaz de voar distâncias consideráveis e de defecar em vôo. A compreensão dessa interação poderá se traduzir em ferramenta no manejo de reservas naturais, contribuindo significativamente para a manutenção da diversidade biológica.

Objetivos Específicos

- Baseado no conhecimento de uma inter-relação mutualística entre plantas e morcegos frugívoros, buscar o entendimento da preferência dos morcegos *Carollia perspicillata* pelos frutos maduros de *Piper gaudichaudianum*. Para isto:
 - Fazer o estudo fitoquímico dos frutos imaturos e maduros desta espécie, identificando os metabólitos secundários não voláteis nos dois estágios de maturação dos frutos.
 - Extrair o óleo essencial dos frutos imaturos e maduros desta espécie, por meio de aeração e hidrodestilação, identificando seus componentes, nos dois estágios de maturação dos frutos.

- Analisar a composição do óleo essencial, bem como a concentração dos componentes presentes em cada amostra, por meio de comparação dos seguintes parâmetros:
 - Aeração e hidrodestilação
 - Frutos imaturos e frutos maduros
 - Frutos coletados em períodos diferentes, manhã, tarde e noite.
- Realizar testes de campo, observando os componentes responsáveis pela atração dos morcegos até os frutos, verificando se o odor é um fator relevante para a aproximação de *C. perspicillata*.

3

Metodologia

3.1

Métodos gerais

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram registrados em equipamento BOMEM MB – 100. As amostras foram preparadas na forma de um filme líquido de diclorometano (CH_2Cl_2) e as absorções expressas em número de onda (cm^{-1}).

Os espectros de absorção no ultravioleta (UV) foram registrados em um espectrofotômetro Hewlett Packard 8452 A. Utilizou-se uma cela de quartzo de 1cm, e como solvente diclorometano.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram registrados em espectrômetros Varian Gemini – 300 BB (300 MHz). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono -13 (RMN ^{13}C) foram registrados em espectrômetros Varian Gemini (75,5 MHz). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e metanol deuterado (CD_3OD) utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm.

Os óleos essenciais foram analisados por um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas – CG/EM – (Varian Saturn 2000) nas seguintes condições: coluna VA-5 (5% Phenyl-Methyl polysiloxane; 30 x 0,25 x 0,25),

temperatura do injetor 250°C, rampa de aquecimento 60°C - 3°C/min - 240°C, hélio como gás de arraste, fluxo de 1 ml/min.

A identificação dos constituintes foi realizada com base nos índices de retenção (Adams, 1995; Van Del Dol e Kratz, 1964), calculados a partir da co-injeção de uma mistura de n-alcanos, e por comparação de seus espectros de massas.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um Micromass QTOF. Os espectros foram feitos pela técnica de ionização electrospray (ESI).

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck, sobre suporte de vidro (espessura 0,50 mm). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada de ultravioleta e posterior revelação com anisaldeído e aquecimento.

As cromatografias em camada preparativa (CCP) foram efetuadas em sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck, sobre suporte de vidro (espessura 1,00 mm). Os compostos foram detectados por irradiação com lâmpada de ultravioleta.

As cromatografias em coluna foram feitas com sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) da Merck, como fase estacionária. A proporção da sílica é cerca de 20 vezes o peso do produto bruto a ser purificado.

Para cromatografia em camada delgada acelerada radialmente (CCDC), foram utilizadas placas de vidro circular (raio = 12 cm), cobertas com camada de sílica gel PF₂₅₄ e sulfato de cálcio 10%, com espessura de 1 mm. Esse tipo de cromatografia foi realizada no Chromatotron, com velocidade de fluxo do eluente igual a 1 ml / min e gradiente de éter de petróleo / clorofórmio.

Os solventes empregados eram de grau comercial e foram previamente tratados de acordo com procedimentos descritos na literatura (Perrin, 1988).

3.2

Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal ocorreu no Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo (PEVR), localizado no município de Fênix-PR.

Ocorreram duas coletas, em épocas diferentes: na primeira (março/1999), foram coletados frutos imaturos, na segunda (janeiro/2000), frutos imaturos e frutos maduros. Na primeira coleta não se obteve quantidades suficientes de frutos maduros. Para garantir a quantidade necessária de frutos maduros para o estudo fitoquímico e extração dos óleos essenciais, os frutos prestes a amadurecer, foram protegidos com saco plástico (figura 4) ou tecido (figura 5). Dessa forma, evitou-se o ataque dos morcegos, além de impedir a queda do fruto ao amadurecer.



Figura 4. Frutos de *P. gaudichaudianum* prestes a amadurecer protegidos com saco plástico, coletados no PEVR.



Figura 5. Frutos de *P. gaudichaudianum* prestes a amadurecer protegidos com tecido, coletados no PEVR.

3.3

Metabólitos Secundários compostos não voláteis

3.3.1 Extração

O material vegetal, (frutos imaturos e frutos maduros), foi seco em estufa a 40° C, moído e extraído separadamente em Soxhlet com solventes de polaridades crescentes (éter de petróleo, diclorometano e etanol) – Tabela 2.

Tabela 2. Extratos brutos dos frutos imaturos e maduros de *P. gaudichaudianum*

Material vegetal	Quant.	Éter de petróleo (EEP)	Diclorometano (ECH ₂ Cl ₂)	Etanol (EE)
Frutos imaturos	22,0g	419mg	741mg	2,952g
Frutos maduros	18,0g	84mg	437mg	6,862g

3.3.2 Purificação

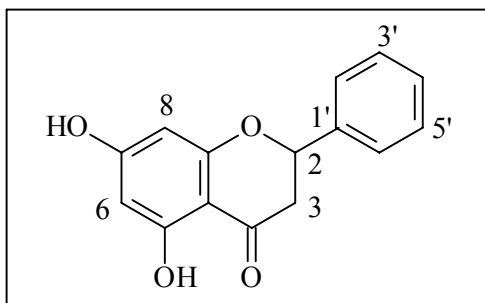
Extratos brutos trabalhados:

3.3.2.1 E(CH₂Cl₂)_{fr} – extrato diclorometânico dos frutos imaturos

fluxograma 1 página 36

Substâncias purificadas:

Substância 1



Aspecto físico: sólido branco

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): Tabela 10 (Anexo A pág. 99) Figura 12 (Anexo B pág. 112)

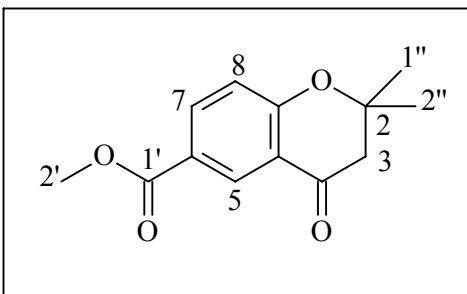
RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃): Tabela 10 (Anexo A pág. 99) Figura 13 (Anexo B pág. 112)

EM [m/z (%): 256 [M]⁺ (100); 179 [M – C₆H₅] (37,3); 152 [M – 104] (50,1); 104 [M – 152] (41,1); 124 [M – 104 – CO] (34,5): Figura **14** (Anexo B pág. 113)

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme de CH₂Cl₂, cm⁻¹): 1628; 3433: Figura **15** (Anexo B pág. 113)

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ) (M): 248 (2,5); 281 (2,7); 308 (2,9) : Figura **16** (Anexo B pág. 114)

Substância 2



Aspecto físico: sólido amarelado

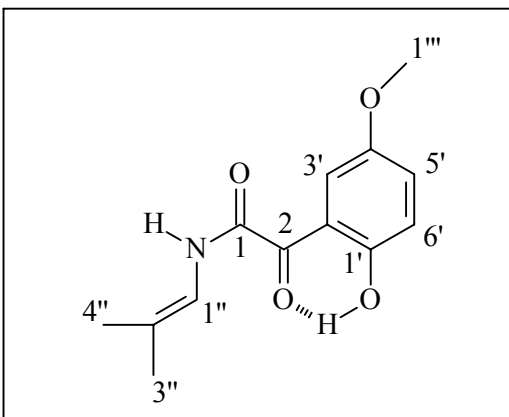
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): Tabela **11** (Anexo A pág. 100) Figura **17** (Anexo B pág. 115)

RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃): Tabela **11** (Anexo A pág. 100) Figura **18** (Anexo B pág. 115)

EM [m/z (%): 234 [M]⁺ (33,9); 219 [M – Me] (100); 203 [M – OCH₃] (10,3); 147 [M – OCH₃ – 56] (37,8): Figura **19** (Anexo B pág. 116)

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme de CH₂Cl₂, cm⁻¹): 1613; 1697; 1720: Figura **20** (Anexo B pág. 116)

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ) (M): 227 (2,5); 233 (2,7); 264 (0,8) : Figura **21** (Anexo B pág. 117)

Substância 3

Aspecto físico: sólido marrom

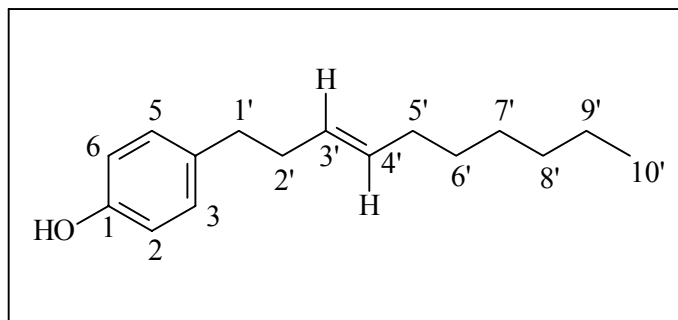
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): Tabela **12** (Anexo A pág. 101) Figura **22** (Anexo B pág. 118)

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3): Tabela **12** (Anexo A pág. 101) Figura **23** (Anexo B pág. 118)

EM [m/z (%]): 249 $[\text{M}]^+$ (3); 219 $[\text{M} - \text{H}_2\text{CO}]$ (100): Figura **24** (Anexo B pág. 119)

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme de CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 1581; 1640; 1714; 3441: Figura **25** (Anexo B pág. 119)

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ) (M): 270 (2,8); 299 (2,6); 342 (2,3) : Figura **26** (Anexo B pág. 120)

Substância 4

Aspecto físico: óleo amarelado

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): Tabela **13** (Anexo A pág. 102) Figura **27** (Anexo B pág. 121)

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3): Tabela **13** (Anexo A pág. 102) Figura **28** (Anexo B pág. 121)

EM [m/z (%): 232 [M] $^+$ (1,04); 107 [$\text{M} - 125$] (100); 77 [C_6H_5] (8): Figura **29** (Anexo B pág. 122)

IV $\nu_{\text{máx}}$ (filme de CH_2Cl_2 , cm^{-1}): 3345,4; 2922,8; 3021: Figura **30** (Anexo B pág. 122)

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm, log ϵ) (M): 286 (0,8) : Figura **31** (Anexo B pág. 123)

3.3.2.2 $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fm}}$ – extrato diclorometânico dos frutos maduros

fluxograma **2** página 37

Substâncias purificadas: **2** (8 mg), **3** (7 mg), e **4** (18 mg), já purificadas no $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fi}}$

3.3.2.3 EE_{fi} – extrato etanólico dos frutos imaturos

Fluxograma **3** página 38

Substâncias purificadas: **2** (4 mg) e **4** (8 mg), já purificadas no $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fi}}$ e no $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fm}}$

3.3.2.4 EE_{fm} – extrato etanólico dos frutos maduros

Devido a sua alta polaridade, teve tratamento diferenciado.

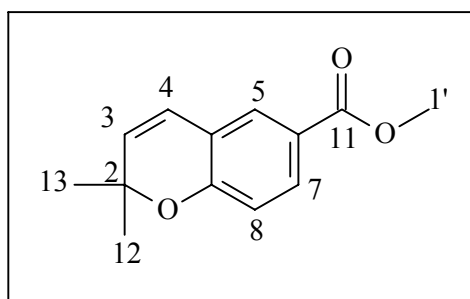
Utilizando-se 3,0 g do EE_{fm} fez-se uma suspensão em água (40 mL). Em seguida, foi submetido a uma extração com solventes de polaridades crescentes (clorofórmio, acetato de etila e n-butanol). Foram feitas 3 extrações com cada solvente, utilizando-se 50 mL de solvente em cada uma delas.

a) Fração clorofórmio (m=290 mg)

Fluxograma **4** página 39

Substâncias purificadas: **2** (8 mg) e **4** (23 mg), já purificadas no $E(CH_2Cl_2)_{fi}$ e no $E(CH_2Cl_2)_{fm}$, além da substância **6** (3 mg).

Substância 6



Aspecto físico: óleo amarelado

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): Tabela **15** (Anexo A pág. 104) Figura **36** (Anexo B pág. 127)

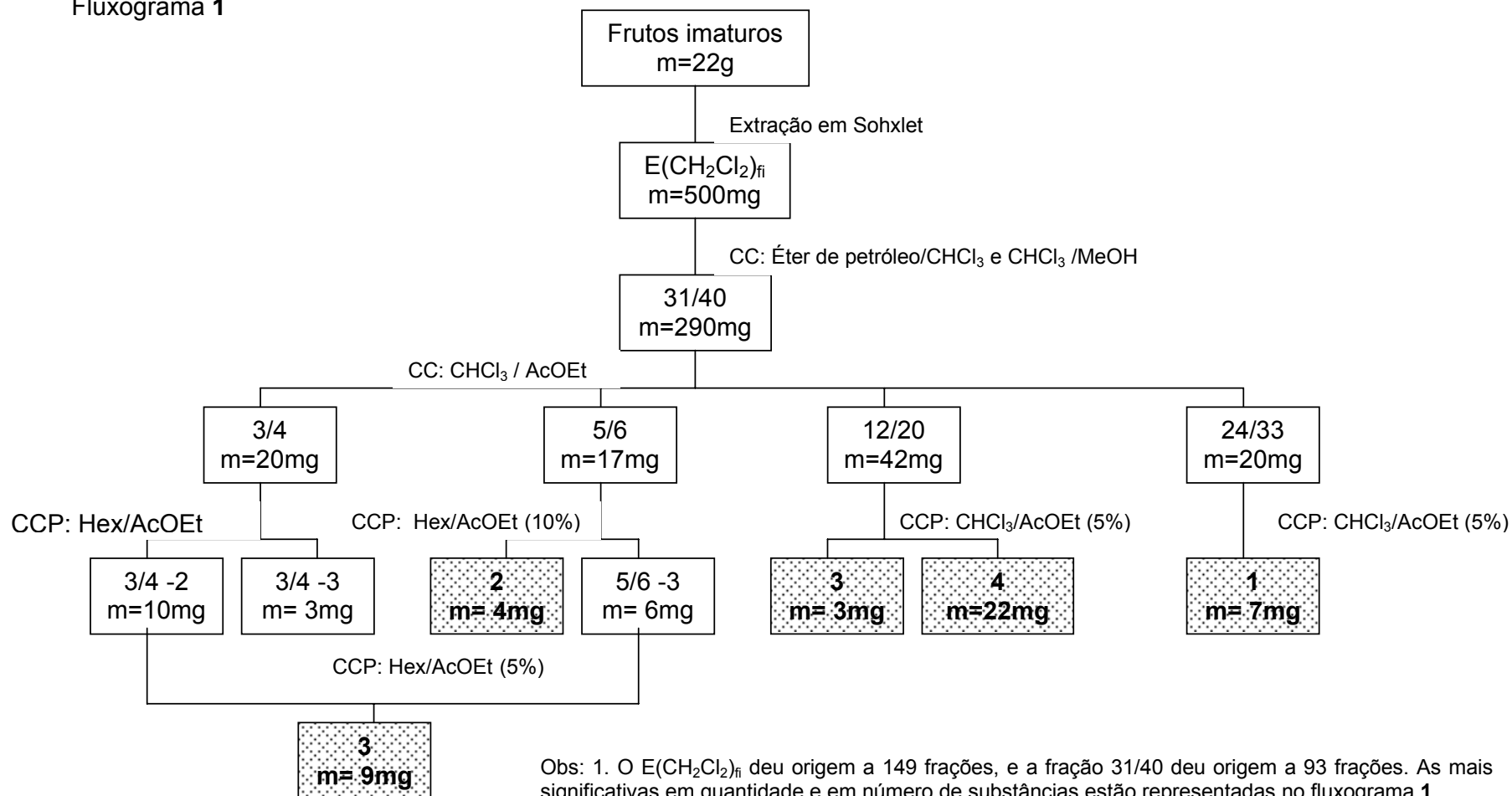
RMN ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$): Tabela **15** (Anexo A pág. 104) Figura **37** (Anexo B pág. 127)

UV $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm, log ϵ) (M): 271 (2,8); 295 (2,7): Figura **38** (Anexo B pág. 128)

b) Fração n-butanol

Fluxograma **5** página 40

Fluxograma 1

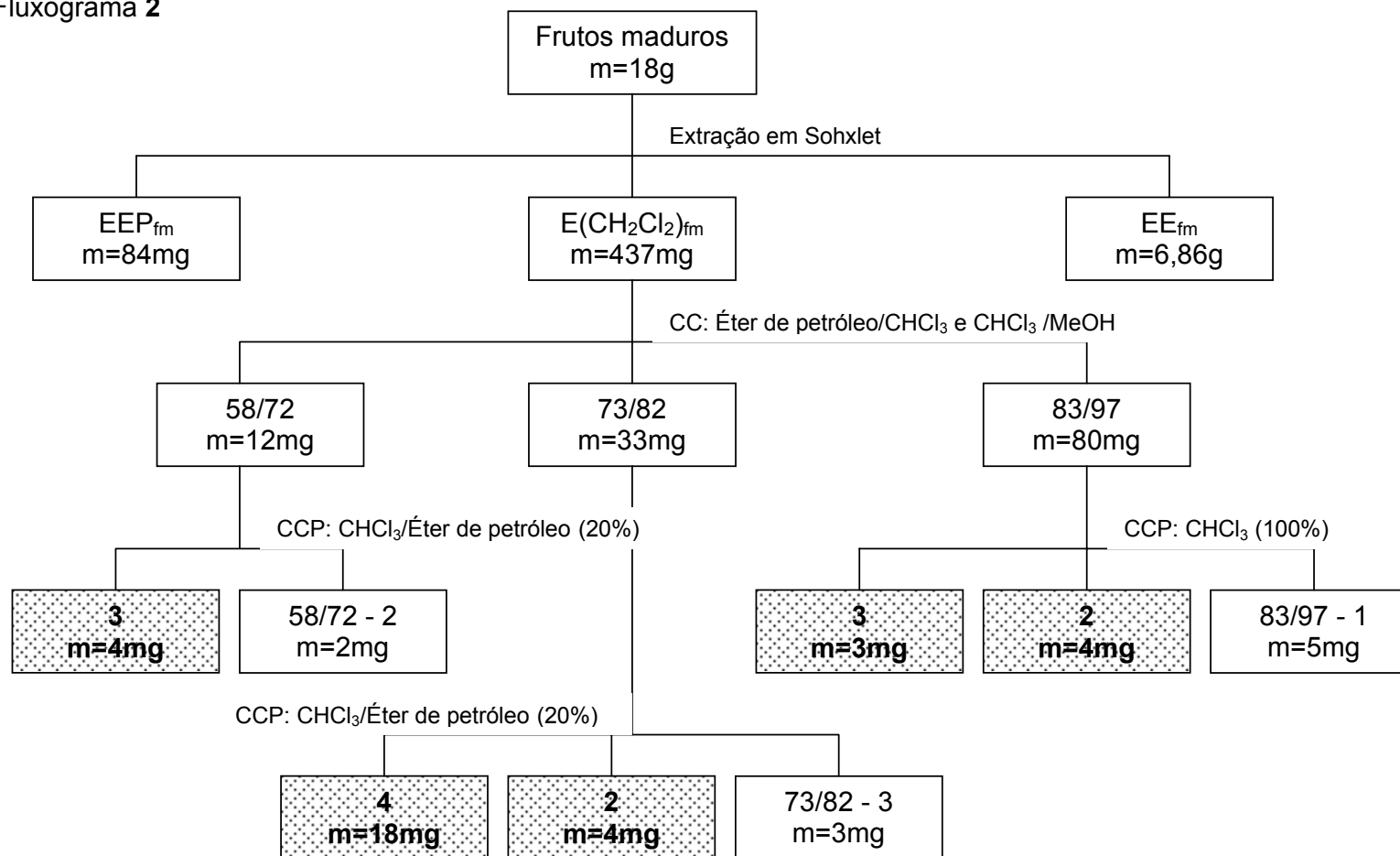


Obs: 1. O $E(CH_2Cl_2)_{fi}$ deu origem a 149 frações, e a fração 31/40 deu origem a 93 frações. As mais significativas em quantidade e em número de substâncias estão representadas no fluxograma 1

2. CCP – Cromatografia em Camada Preparativa

3. CC – Coluna Cromatográfica

Fluxograma 2

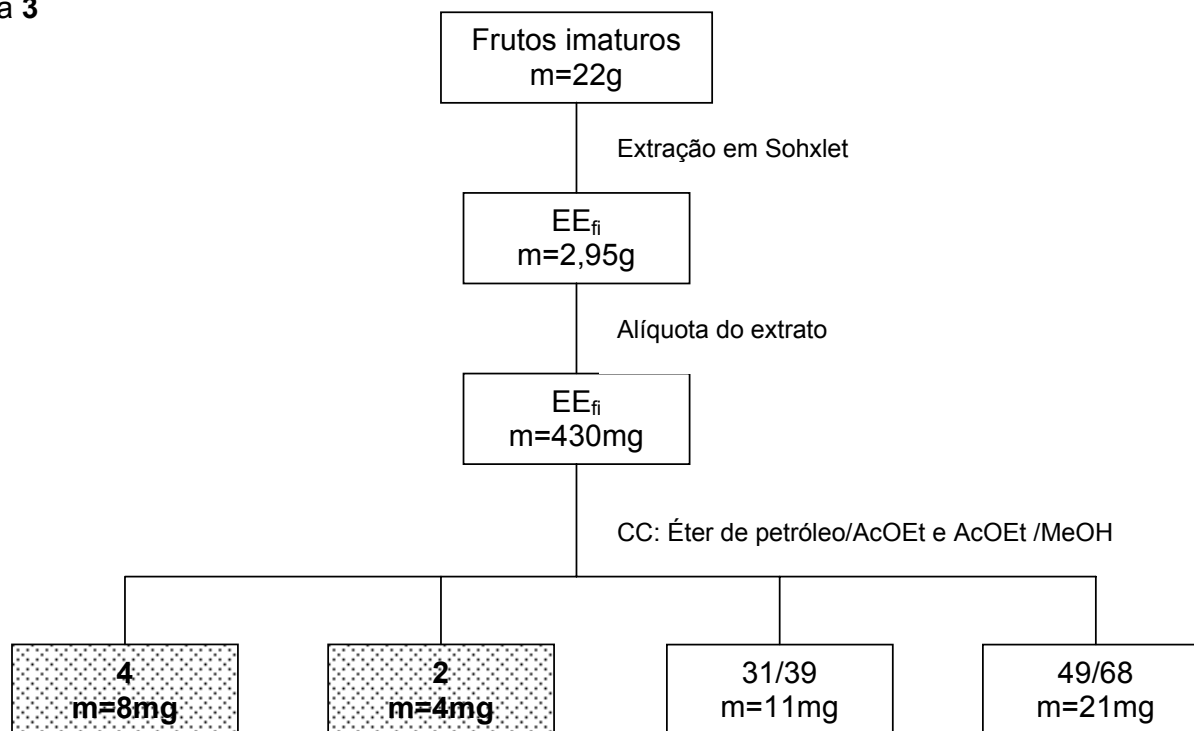


Obs: 1. O $E(CH_2Cl_2)_{fm}$ deu origem a 186 frações. Estão representadas no fluxograma 2 somente as mais significativas em quantidade e em número de substâncias

2. CCP – Cromatografia em Camada Preparativa

3. CC – Coluna Cromatográfica

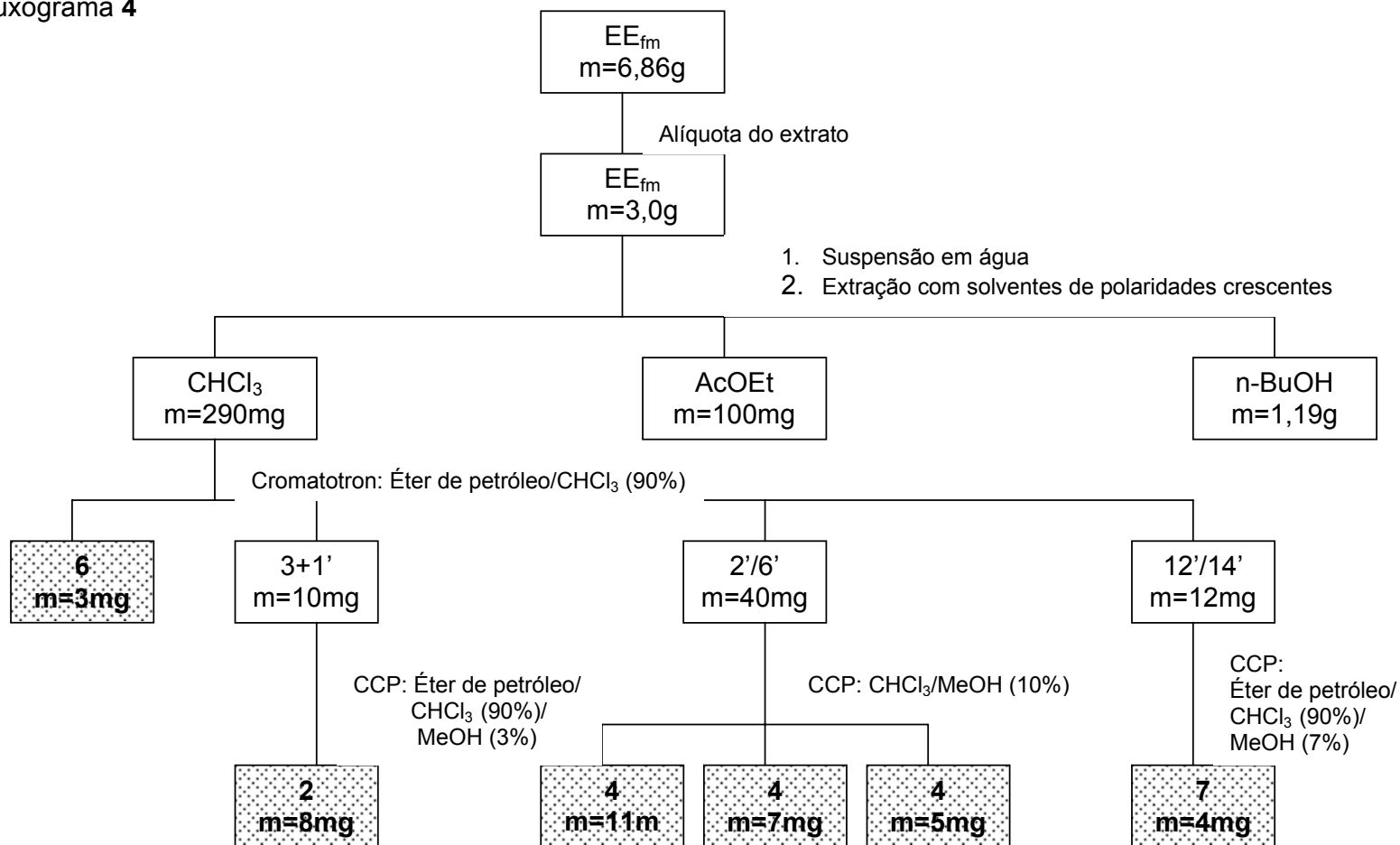
Fluxograma 3



Obs: 1. O EE_{fi} deu origem a 68 frações. As mais significativas em quantidade e em número de substâncias estão representadas no fluxograma 3

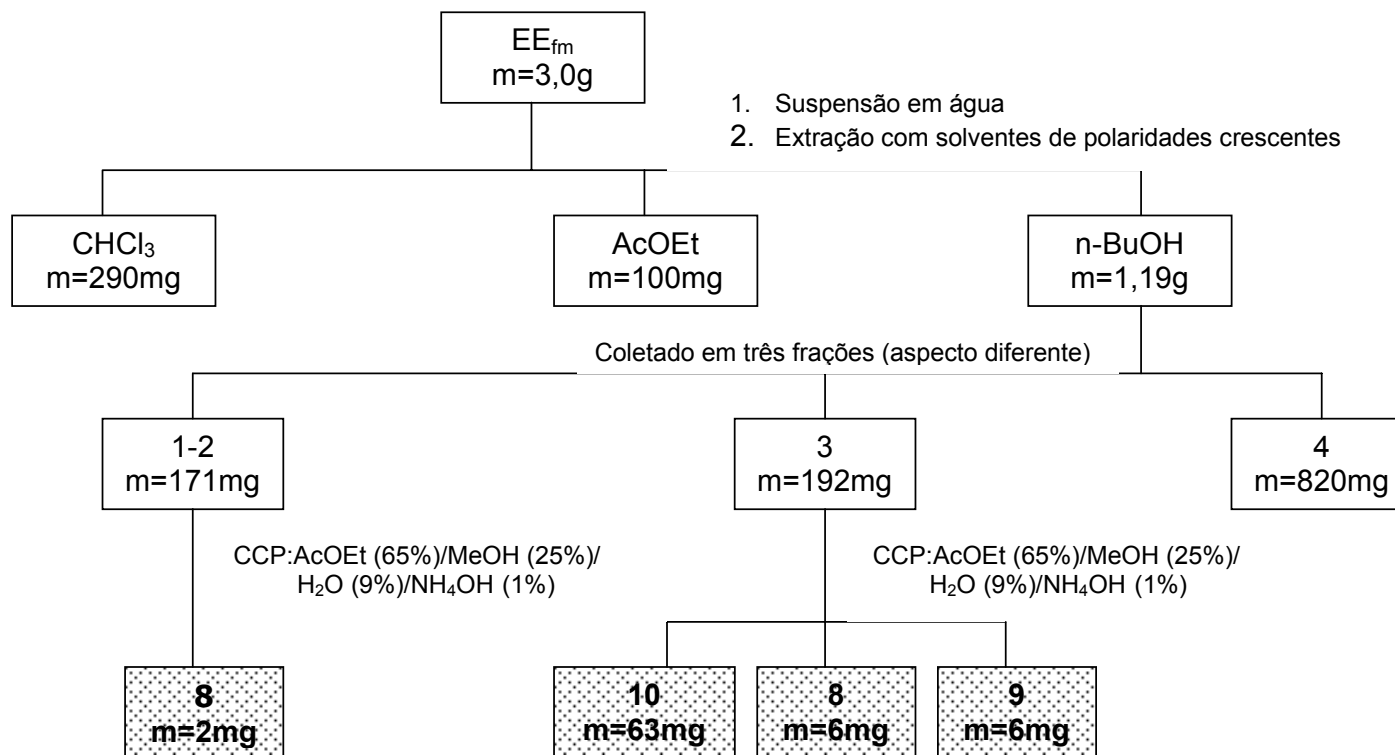
2. CC – Coluna Cromatográfica

Fluxograma 4



1. CCP – Cromatografia em Camada Preparativa
2. CC – Coluna Cromatográfica

Fluxograma 5



1. CCP – Cromatografia em Camada Preparativa
2. CC – Coluna Cromatográfica

3.3.3 Identificação

Os metabólitos secundários isolados foram identificados pelos métodos espectroscópicos usuais: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C), além de HETCOR, COSY, espectrometria de massas de alta resolução, ultravioleta e infravermelho.

3.3.4 Microderivatizações

A substância **4** (derivado fenólico), foi submetida ainda às seguintes reações:

3.3.4.1 Metilação com diazometano: - solubilizada em éter etílico, adicionou-se excesso de diazometano. A metilação não se efetivou.

3.3.4.2 Metilação com iodometano: - (Mackenzie, 1986) em um balão, colocou-se em refluxo, a amostra **4** (13 mg; 0,0560 mmol), carbonato de potássio anidro (40 mg; 0,2898 mmol), iodometano (0,1 ml) e acetona seca. Após 32 h de reação, o produto foi analisado em CG-EM (Varian Saturn 2000), nas seguintes condições: coluna VA-5 (30x0,25x0,25), temp. do inj. 250° C, rampa de aquecimento 150° C - 10° C/min - 230° C. O rendimento foi de 80% da substância **4** metilada (**5**).

3.3.4.3 Derivatização com dissulfeto de metila (DMDS) (Scribe, 1988), para confirmação da posição da insaturação: preparou-se uma solução da substância metilada (**5**) em diclorometano (1 ml; $4,065 \times 10^{-3}$ mmol). A 0,06 ml dessa solução foi adicionado uma alíquota (0,1 ml) da mistura da solução de DMDS em hexano (1 ml; $4,065 \times 10^{-3}$ mmol ou 10% v/v; 1 ml) com uma alíquota (0,4 ml) da solução de iodo em éter etílico (0,1968 M; 1 ml; 0,1968 mmol). A reação foi mantida a 50°C por 24 horas. O excesso de iodo foi reduzido pelo tratamento com solução de tiosulfato de

sódio (5% em água destilada). A fase orgânica foi extraída com 0,5 ml de hexano e concentrada com gás nitrogênio. Uma alíquota foi analisada em CG/EM (Varian Saturn 2000), nas seguintes condições: coluna VA-5 (30x0,25x0,25), temp. inj. 250° C, rampa de aquecimento 150° C - 10° C/min -280° C.

3.3.4.4 Epoxidação: - (Attygalle, 1998) – Preparou-se uma solução da amostra **5** em diclorometano ($3,658 \times 10^{-6}$ M; 10 ml; 0,3658 mmol). Adicionou-se uma solução do ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) em diclorometano (0,028 M; 10 ml; 1,29 mmol). A reação foi mantida em temperatura ambiente por 4 horas. Alíquotas da mistura foram analisadas por CG-EM (Varian Saturn 2000), nas seguintes condições: coluna VA-5 (30x0,25x0,25), temp. do inj. 250° C, utilizando a rampa de aquecimento 150° C - 10° C/min -230° C. Ao final da reação, o excesso de ác. *m*-CPBA foi retirado, utilizando uma solução de carbonato de sódio (5% em água destilada), e a seguir a fase orgânica foi extraída com éter etílico e seca com sulfato de sódio anidro. Uma alíquota do produto da reação foi injetada no CG-EM, nas mesmas condições já citadas anteriormente. O rendimento foi de 95% da substância **5** epoxidada.

3.3.5 Testes Biológicos

Os testes biológicos foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP, pela Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte.

3.3.5.1 Microrganismos. Testes de atividade antimicrobiana foram realizados contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC13388, *Salmonella choleraesuis* CCT4296, *Rhodococcus equi* CCT0541, *Micrococcus luteus* CCT2692, *Staphylococcus aureus* CCT2740, *Escherichia coli* CCT0547, *Bacillus subtilis* CCT2576, *S. epidermidis* ATCC12228, *Streptococcus faecium* ATCC10541, *Enterococcus faecium* CCT5079 e contra a levedura *Candida albicans* CCT776.

3.3.5.2 Meios de cultura para manutenção dos microrganismos. As bactérias foram preservadas em meio Nutriente Agar e a levedura *C. albicans* em meio Sabouraud Dextrose Agar. Para os testes de atividade, os microrganismos foram repicados nos referidos meios e incubados em estufa a 36°C, até crescimento.

3.3.5.3 Teste de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição (Eloff, 1998). Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços, foram depositados 100 µL de caldo Mueller-Hinton (bactérias) ou caldo Sabouraud dextrose (*C. albicans*), com exceção da coluna 12, utilizada para os controles. Na coluna 1 – linha A foram acrescentados 50 µL da substância a ser testada, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna). Cloranfenicol e nistatina foram utilizados como padrões no caso das bactérias e *C. albicans*, respectivamente. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, 100 µL de uma suspensão do microrganismo de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland nº 0,5 e diluídos para concentração final de 10⁴ células/mL foram adicionados. As placas foram seladas com parafilm e incubadas por 24 h a 32°C. Após este período foi acrescentado 20 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifenil tetrazolium) à 0,5%, e a placa re-incubada por 3 h na referida temperatura. A MIC foi definida como a menor concentração capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha.

3.4

Metabólitos Secundários compostos voláteis

3.4.1 Aeração A

A aeração A (Millar, 1998) foi feita em campo, à temperatura ambiente, utilizando frutos imaturos e frutos maduros, nos três períodos do dia (24 h): manhã, tarde e noite. Logo após a coleta, os frutos (2-5 no caso dos maduros, 10-15 quando imaturos) eram colocados na câmara de vidro e a aeração era iniciada. Como adsorvente foi utilizado carvão e, como dessorvente, hexano. O tempo de aeração foi de 1 h para cada amostra. As amostras (seis) foram armazenadas em frascos e mantidas congeladas até a análise.

Os óleos foram analisados por CG/EM (Varian Saturn 2000), nas seguintes condições: coluna VA-5 (30x0,25x0,25), temp. inj. 250° C, rampa de aquecimento 60° C - 3° C/min -240° C, gás hélio, fluxo de 1ml/min.

A identificação dos constituintes foi realizada com base nos índices de retenção (Adams 1995, Van del Dol e Kratz 1964), calculados a partir da co-injeção de uma mistura de n-alcanos, e por comparação dos seus espectros de massas.

3.4.2 Aeração B

A aeração B (Millar, 1998) foi feita em campo, à temperatura ambiente, utilizando frutos imaturos e frutos maduros, além do branco, nos três períodos do dia (24 h): manhã, tarde e noite. Logo após a coleta, cada porção de material vegetal (aproximadamente 25 g) era submetido a aeração, totalizando seis amostras. Como

adsorvente foi utilizado o polímero Super Q e, como dessorvente, hexano. O tempo de extração foi de 4h para cada amostra. As amostras assim obtidas foram armazenadas em ampolas fechadas em campo com maçarico e mantidas congeladas até a análise.

As análises dos frutos foram feitas da mesma forma que na aeração A.

A figura 6 mostra o sistema de aeração utilizado em campo na Aeração A e na Aeração B.



Figura 6. Sistema de aeração utilizado no PEVR

3.4.3 Hidrodestilação

A hidrodestilação foi realizada em laboratório, utilizando um aparelho de Clevenger modificado (figura 7), segundo a farmacopéia alemã (Deutsches Arzneibuch 10, 1991). Foi extraído o óleo essencial dos frutos imaturos e dos maduros, coletados nos três períodos do dia (24 h), manhã, tarde e noite. Esse material foi mantido congelado até a sua utilização na hidrodestilação. O tempo de extração para cada amostra foi de 4 horas. O óleo essencial assim obtido foi armazenado em ampolas até serem submetidos à análise. Esta análise ocorreu da mesma forma que nas aerações A e B (itens 3.4.1 e 3.4.2).

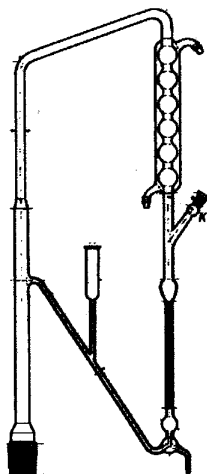


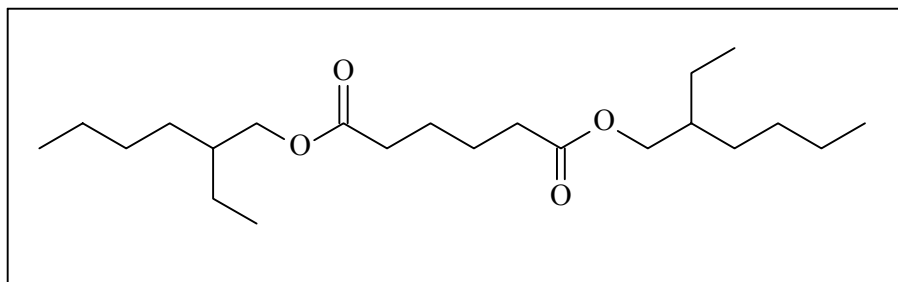
Figura 7. Aparelho de Clevenger modificado utilizado para hidrodestilação em laboratório

3.4.4 Síntese

Síntese do éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodióico: (Shakir, 1995). em um balão contendo dicitloexilcarbodiimida, DCC, (172 mg; 0,833 mmol) foi adicionada uma solução de 4-dimetilaminopiridina, DMAP, em diclorometano (0,0177 M; 3 ml; 0,0532 mmol), a uma temperatura de 0° C e sob agitação. A esta solução foi adicionado simultaneamente, 2-etilexanol (0,12 ml) e uma solução de ácido adípico em diclorometano (0,1278 M; 3 ml; 0,3835 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente por 24 h, sendo então filtrada em coluna de celite. O éster obtido foi purificado por coluna cromatográfica (sílica gel), utilizando como solvente de eluição, éter de petróleo/éter etílico (9:1). O rendimento foi de 51%.

A análise do produto da reação foi feita por meio do CG-EM (Varian Saturn 2000), nas seguintes condições: coluna VA-5 (30x0,25x0,25), temp. inj. 250° C, rampa de aquecimento 60° C - 3° C/min -240° C, gás hélio, fluxo de 1ml/min., mesmas condições em que foi analisada a amostra do óleo essencial dos Frutos Maduros noite (FM_n) onde foi detectado este composto.

Éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodióico

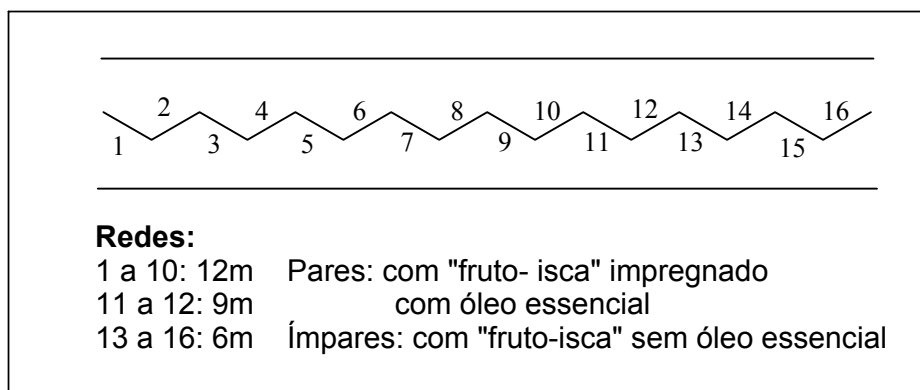


Aspecto físico: óleo incolor

EM (m/z): 371 $[M]^+$; 259 ($M - 112$); 147 ($M - 224$); 129 ($147 - H_2O$); 111 ($129 - H_2O$)

3.4.5 Testes de Campo

3.4.5.1 Captura em redes de neblina - A captura dos morcegos foi realizada com a utilização de 16 redes de neblina, dispostas em zigue-zague ao longo de uma trilha existente no PEVR, numeradas de 1 a 16. No esquema 1 (abaixo) está sendo mostrado a numeração, o comprimento e a disposição das redes ao longo trilha.



Esquema 1. Disposição das redes de neblina na trilha do PEVR

Em cada rede de número par, foi colocado um “fruto-isca”, imitação de fruto de *P. gaudichaudianum*, feito de espuma verde, sem cheiro, preso à rede. Cada

“fruto” foi impregnado com em média, 12 gotas de óleo essencial, extraído por hidrodestilação de frutos maduros de *P. gaudichaudianum*, coletados em período anterior, no mesmo Parque. O óleo extraído havia sido armazenado em ampolas, que foram abertas em campo.

Em cada rede de número ímpar foi colocado um “fruto-isca” não impregnado com óleo essencial. Essas redes atuaram como controle.

Cada teste de campo consistiu de 4 noites consecutivas, preferencialmente no período de lua nova, quando a luminosidade natural é menor.

As redes foram abertas ao anoitecer e foram monitoradas a cada 15 minutos durante as 6 horas subseqüentes.

3.4.5.2 Coleta de fezes - cada animal capturado foi deixado dentro de sacos de algodão por no mínimo 30 minutos, para a coleta de fezes

3.4.5.3 Identificação dos frutos consumidos - a análise da dieta dos morcegos capturados foi feita com base nas amostras fecais coletadas. As amostras de fezes tiveram as sementes isoladas, quantificadas e identificadas com base em uma coleção de referência já disponível para a área de estudo

3.4.5.4 Identificação dos morcegos - após a retirada do morcego do saco de algodão onde ele permaneceu para a coleta de fezes procedeu-se a identificação e o posterior retorno do animal vivo ao seu ambiente.

4

Resultados e Discussão

O estudo fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* é inédito, e são poucos os trabalhos em ecologia química envolvendo Piperaceae. Os frutos dessa família têm como principais consumidores os morcegos, estes se constituem nos principais dispersores de suas sementes. Eles, os morcegos, atuam como recompositores de ecossistemas tropicais, mas têm recebido pouca atenção, apesar de sua importância em termos de ecologia (Gorchow et al, 1993). Pouco se sabe também, sob o ponto de vista químico, da sua preferência alimentar por frutos de *Piper*. O estudo dos componentes voláteis e não voláteis, principalmente dos frutos, é um fator relevante para a interpretação de sua dieta. Como já foi descrito, o morcego *Carollia perspicillata* é um animal de hábito noturno, consome apenas os frutos maduros de *Piper*. Com base nessas informações, nossa proposta envolve o estudo dos componentes não voláteis e dos componentes voláteis – óleos essenciais – dos frutos maduros e imaturos com o objetivo de facilitar, por meio de comparação, o entendimento da preferência alimentar do morcego. No caso do estudo dos componentes voláteis, fez-se a coleta nos três períodos, manhã, tarde e noite, com a finalidade também de comparação dos resultados.

4.1

Metabólitos Secundários compostos não voláteis

Para o estudo fitoquímico, foram realizadas extrações dos frutos maduros e imaturos em Soxhlet. As quantidades obtidas, utilizando-se solventes de polaridades crescentes estão relatadas na tab. 2 página 31.

É importante salientar a grande dificuldade em se obter material vegetal em quantidade satisfatória para o estudo fitoquímico (compostos não voláteis e voláteis), principalmente de frutos maduros. Em função disso, a quantidade de extrato bruto para o trabalho fitoquímico foi reduzida, acarretando em poucas substâncias isoladas (provavelmente foram isoladas somente aquelas substâncias que estão presentes em maiores concentrações na planta).

Os extratos brutos foram submetidos à análise por RMN ^1H (80 MHz), observando-se que os extratos de mesma polaridade dos frutos imaturos e dos maduros são semelhantes entre si.

Após análise dos extratos por CCD e RMN ^1H , a purificação foi iniciada pelo extrato diclorometânico dos frutos imaturos $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fi}}$. Na sequência fez-se a purificação do extrato etanólico dos frutos imaturos EE_{fi} , finalizando com a purificação dos extratos diclorometânico e etanólico dos frutos maduros $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fm}}$ e EE_{fm} .

4.1.1 $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fi}}$ – extrato diclorometânico dos frutos imaturos

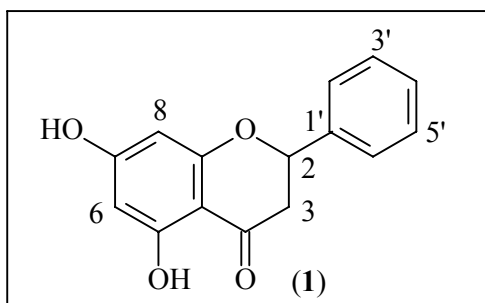
fluxograma 1 página 36

O extrato $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fi}}$ foi submetido a coluna cromatográfica, obtendo-se várias frações, conforme mostra o fluxograma 1. Deste extrato foram isoladas e identificadas 4 substâncias (**1**, **2**, **3** e **4**): flavanona, derivado do ácido benzóico, amida e derivado fenólico, respectivamente.

Espectrometria de massas, bem como ultravioleta, infra-vermelho e ponto de fusão foram feitos para confirmar as estruturas propostas.

A seguir, apresentamos a discussão das propostas das estruturas das substâncias isoladas e identificadas a partir do $\text{E}(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_{\text{fi}}$.

Determinação estrutural da substância 1



A identificação estrutural do composto **1** foi feita com base na análise de seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C [tab. **10** (Anexo A pág. 99) fig. **12** e **13** (Anexo B pág. 112)]. O espectro de RMN ^1H mostra absorções em 5,4 ppm (1H; dd; $J = 12,8$ Hz e $J = 3,0$ Hz), em 3,0 ppm (1H; dd; $J = 17,3$ Hz e $J = 12,8$ Hz) e em 2,8 ppm (1H; dd; $J = 17,3$ Hz e $J = 3,0$ Hz), que são deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamentos típicos de H-2, H-3_{ax} e H-3_{eq} respectivamente, do anel C de uma flavanona. Este anel possui preferencialmente a conformação meia cadeira, onde observa-se claramente os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio deste anel (fig. **8** pág. 51). O valor da constante $J = 17,3$ Hz corresponde ao acoplamento geminal (H-3_{ax} / H-3_{eq}), $J = 12,8$ Hz ao acoplamento axial-axial (H-2 / H-3_{ax}) e $J = 3,0$ Hz ao acoplamento axial-equatorial (H-2 / H-3_{eq}).

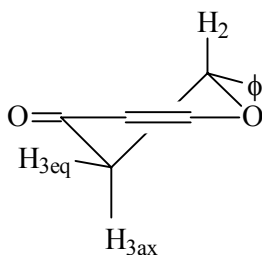


Fig. **8** – Conformação preferencial do anel C da flavanona

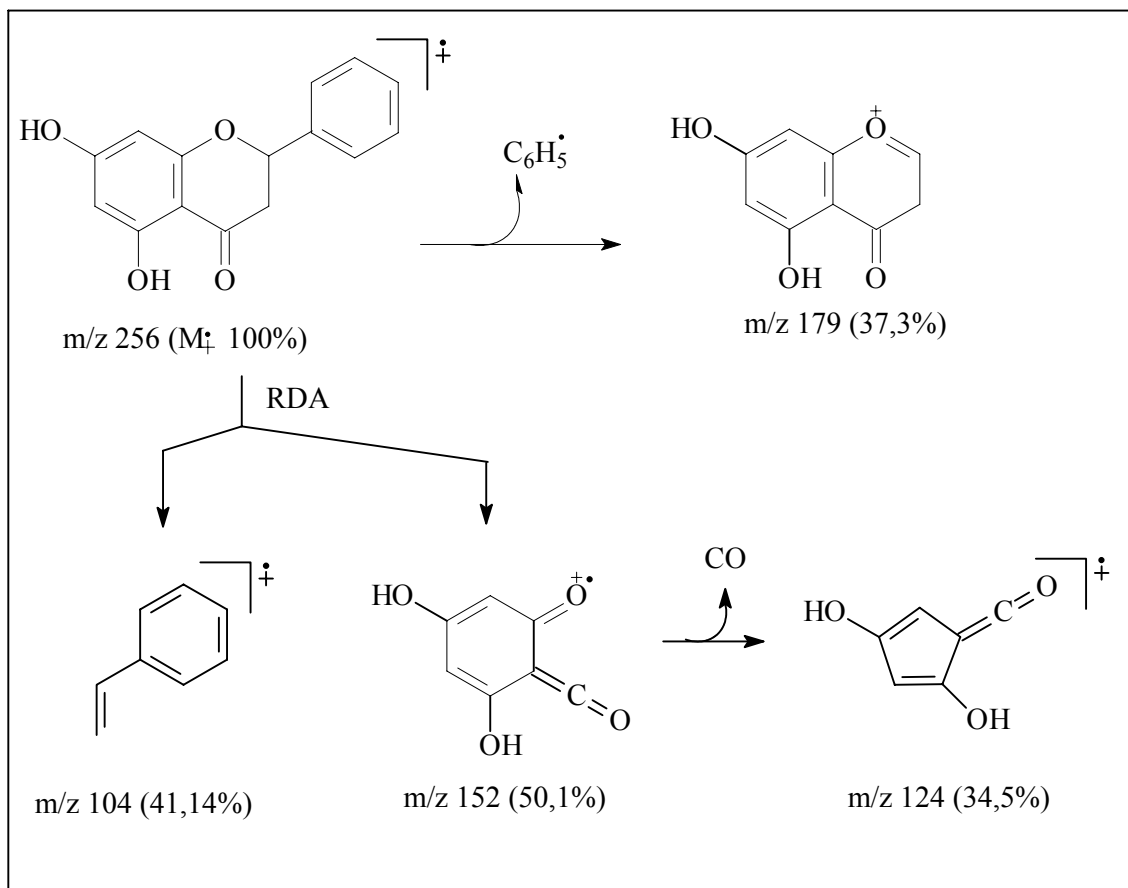
Ainda em relação ao anel C, ao analisar-se o espectro de RMN ^{13}C , associado ao DEPT $135^\circ 90^\circ$, observa-se um sinal em 79,3 ppm (CH; C-2), em 43,4 ppm (CH_2 ; C-3) e em 196,1 ppm (C; C-4), também típicos do anel C de flavanona.

Continuando a análise do espectro de RMN ^1H , observa-se um sinal na região de 7,4 ppm (5H; m) pertencente ao anel B monossustituído da flavanona. Com o auxílio do experimento HETCOR, define-se como sendo ligados aos átomos de carbono em 129,1 ppm (C-3'; C-4'; C-5') e em 126,4 ppm (C-2'; C-6'), unidos ao anel C pelo carbono quaternário em 138,8 ppm (C-1'). Observa-se também um sinal em 6,0 ppm (2H; d; $J = 3,0$ Hz), correspondente aos átomos de hidrogênio H-6 e H-8, cujo valor de $J = 3,0$ Hz sugere um acoplamento meta, indicando que o anel A da flavanona é tetrassustituído. Devido a ausência de qualquer outro sinal no espectro de RMN ^1H , propõem-se como substituintes para o anel A, duas hidroxilas nas posições 5 e 7. Isto estaria de acordo com os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono no espectro de RMN ^{13}C , em 167,2 ppm e em 164,2 ppm, típico de carbono oxigenado e, dos átomos de carbono em 95,9 ppm e em 96,8 ppm, relacionados no experimento HETCOR aos átomos de hidrogênio H-6 e H-8.

O valor de 196,1 ppm (RMN ^{13}C) atribuído ao C-4 é característico da presença de uma hidroxila no C-5 (quelada), já que na ausência da mesma, o deslocamento químico assume valores entre 190,0 e 192,0 ppm aproximadamente, segundo a literatura (Agrawal et al., 1981). A espectrometria de massas para flavanonas é caracterizada pela fragmentação originada da reação de retro-Diels-Alder.

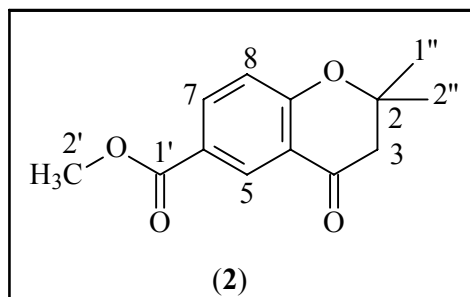
As principais fragmentações observadas no espectro de massas [fig. 14 (Anexo B pág. 113)] da substância **1** estão sendo mostradas no esquema 2.

Todos os dados coincidem com os encontrados na literatura (Agrawal et al., 1981, Burke et al., 1986) para a 5,7-diidroxi flavanona, (**pinocembrina**) (Mabry et al., 1970) isolada de *P. hostmannianum* e *P. steerni* (Parmar et al., 1997).



Esquema 2: Proposta de fragmentação de massas da substância 1.

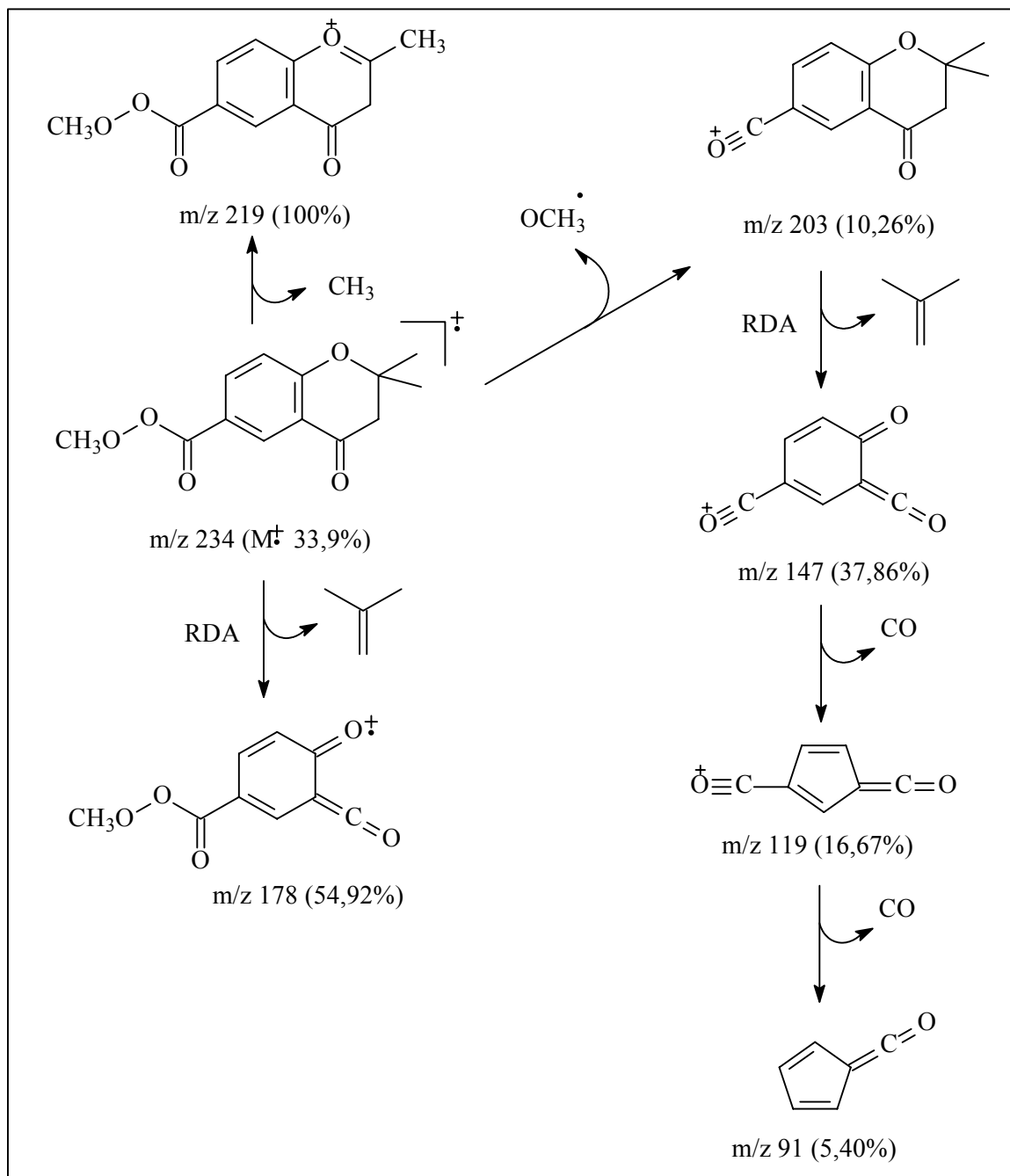
Determinação estrutural da substância 2



A identificação estrutural do composto **2** foi feita com base na análise de seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C [tab. **11** (Anexo A pág. 100) fig. **17** e **18** (Anexo B pág. 115)]. O espectro de RMN ^1H mostra um sinal em 2,7 ppm (2H; s) ligado ao carbono em 48,7 ppm (C-3) definido pelo HETCOR. Mostra também, um sinal em 1,48 ppm (6H; s), cujo HETCOR mostra estarem ligados aos 2 átomos de carbono de mesmo deslocamento químico em 26,6 ppm. O espectro de RMN ^1H mostra ainda, 3 átomos de hidrogênio em 8,5 ppm (H-5; d; $J = 2,0$ Hz), em 8,1 ppm (H-7; dd; $J = 8,1$ Hz e $2,0$ Hz) e em 6,9 ppm (H-8; d; $J = 8,1$ Hz) indicando, pelas constantes de acoplamento (orto e meta), um anel benzênico trissubstituído, cujos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, segundo o espectro de RMN ^{13}C e HETCOR, são respectivamente, 129,2 ppm (C-5), 137,1 ppm (C-7) e 118,8 ppm (C-8). O espectro de RMN ^{13}C mostra também um sinal em 119,8 ppm (C-6), em 163,4 ppm (C-9) e em 123,1 ppm (C-10), todos quaternários atribuídos aos átomos de carbono substituídos do anel benzênico, além de sinais em 80,3 ppm (C-2) e em 191,9 ppm (C-4). Estes dados estão de acordo com a estrutura de uma cromanona. (Le-Van et al., 1981; Roussis et al., 1990).

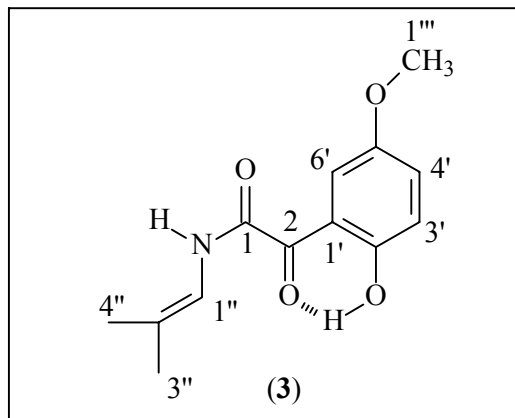
Em adição, observa-se no espectro de RMN ^1H um sinal em 3,9 ppm (H-2';s), correspondente a uma metoxila (C-2') e, finalmente, evidencia-se a presença de um sinal no espectro de RMN ^{13}C em 166,4 ppm, atribuído ao carbono de carbonila de um éster (C-1'). As principais fragmentações do espectro de massas de alta resolução [fig. **19** (Anexo B pág. 116)] estão sendo representadas no esquema **3**.

Propõe-se, então, como estrutura **2**, o 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona, cujos dados de RMN ^1H e ^{13}C são coincidentes com a substância isolada de *Piper taboganum*. Este composto mostrou atividade repelente contra formigas cortadeiras, *Acromyrmex octospinosus*, comum no Panamá. (Roussis et al, 1990).



Esquema 3: Proposta de fragmentação de massas da substância **2**.

Determinação Estrutural da substância 3

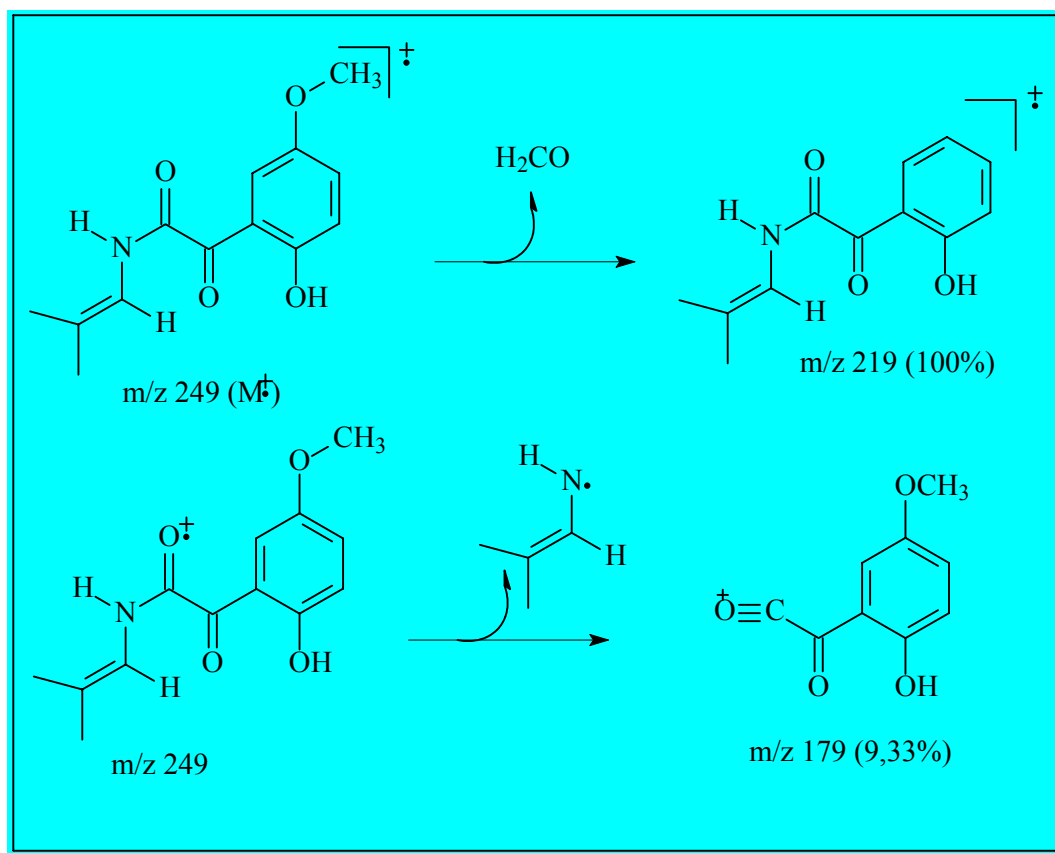


A identificação estrutural do composto **3** foi feita com base na análise de seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C [tab. **12** (Anexo A pág. 101) fig. **22** e **23** (Anexo B pág. 118)]. O espectro RMN ^1H mostra absorções em 7,0 ppm (H-3'; d; J = 8,4 Hz), em 8,1 ppm (H-4'; dd; J = 8,4 Hz e J = 2,1 Hz) e em 8,5 ppm (H-6'; d; J = 2,1 Hz), indicando pelas constantes de acoplamento orto e meta, a presença de anel benzênico trissubstituído. Mostra também absorção em 3,9 ppm (3H; s), ligados ao carbono metoxílico em 52,2 ppm (C-1'''). Observa-se também no espectro de RMN ^1H , um sinal em 6,8 ppm (H-1''; t; J = 1,4 Hz), acoplando com os átomos de hidrogênio em 2,0 ppm (H-4'', d; J = 1,4 Hz) e em 2,2 ppm (H-3''; d; J = 1,4 Hz). Os valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamentos anteriores, ficam justificados quando, com o auxílio do espectro de RMN ^{13}C e do experimento HETCOR, observa-se a absorção dos átomos de carbono em 119,5 ppm (C-1''), em 120,2 ppm (C-2''), em 28,5 ppm (C-4'') e em 21,7 ppm (C-3''), deslocamentos esses que estão sendo atribuídos ao substituinte isobutenila.

O espectro de RMN ^1H mostra ainda uma absorção em 13,2 ppm (1H; s) correspondente ao hidrogênio de uma hidroxila quelada, em posição orto à carbonila C-2, que absorve em 196,0 ppm, de acordo com o espectro de RMN ^{13}C . Segundo a literatura, (Agrawal et al, 1981), quando não existe hidroxila orto à carbonila, esta absorve em campo mais alto, entre 190,0 e 192,0 ppm.

Finalizando, observa-se ainda a existência de uma carbonila absorvendo em 167,3 ppm (C-1).

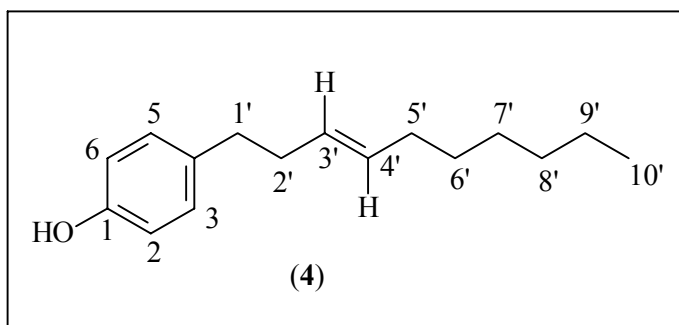
As principais fragmentações observadas no espectro de massas de alta resolução [fig. 24 (Anexo B pág. 119)] estão representadas no esquema 4. A presença do íon molecular M^+ em m/z 249 confirma a presença de nitrogênio na estrutura.



Esquema 4: Proposta de fragmentação de massas da substância 3.

A estrutura proposta trata-se, portanto, de uma amida, a 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-2-oxo-acetamida, inédita como produto natural.

Determinação estrutural da substância 4



A identificação estrutural do composto **4** foi feita com base na análise de seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C [tab. **13** (Anexo A pág. 102) fig. **27** e **28** (Anexo B pág. 121)]. O espectro de RMN ^1H mostra absorções em 7,0 ppm (H-2 e H-6; d; $J = 8,5$ Hz), em 6,7 ppm (H-3 e H-5; d; $J = 8,5$ Hz), indicando um anel benzênico *para*-substituído. Mostra em 5,4 ppm (H-3' e H-4'; m), absorção referente aos átomos de hidrogênio da ligação dupla. Este sinal, um multipeto, impossibilita a definição das constantes de acoplamento e, conseqüentemente da estereoquímica da substância. Utilizando os espectros de RMN ^{13}C , DEPT 135 0 e 90 0 e os experimentos HETCOR e COSY define-se os deslocamentos químicos de C-3' em 131,4 ppm e C-4' em 129,5 ppm. Observa-se ainda no espectro de RMN ^1H sinais em 2,5 ppm (H-1'; m), em 2,2 ppm (H-2'; m) e em 1,9 ppm (H-5'; m) que, com o auxílio do experimento HETCOR, foram definidos como estando ligados respectivamente ao C-1', C-2' e C-5'. A ordem dos átomos de carbono na cadeia carbônica baseia-se no espectro COSY. A absorção centrada em 1,2 ppm (H-6', H-7', H-8' e H-9'; m) representa os átomos de hidrogênio ligados aos C-6', C-7', C-8', C-9' determinados pelo experimento HETCOR. O sinal em 0,8 ppm (H-10'; t) se constitui no grupo metila terminal, C-10'. Finalmente, o espectro de RMN ^{13}C mostra uma absorção em 153,7 ppm, correspondendo ao deslocamento químico do C-1, tendo como substituinte uma hidroxila.

O espectro de massas de alta resolução está representado na fig. **29** (Anexo B pág. 122) e sua proposta de fragmentação no esquema **5** pág. 60.

O espectro no infravermelho [Fig. 30 (Anexo B pág. 122)] apresenta absorções em 3345, 3021 e 966 cm^{-1} referentes ao estiramento da hidroxila, do anel aromático e deformação angular de CH de alquenos, respectivamente.

Apesar do gênero *Piper* ter sido intensamente estudado, alquenilfenóis têm sido raramente isolados. Há o relato de um C-16 alquenilfenol isolado de *P. hispidum* (Vieira, 1980). Orjala, em um artigo de 1998, mostra o isolamento e identificação de um composto idêntico ao **4**, extraído de *P. gibbilimum*, denominado **gibbilimbol B**. A posição da ligação dupla foi determinada por experimentos espectroscópicos usuais e a estereoquímica (4-(3'(*E*)-decenilfenol) foi elucidada apenas por comparação do deslocamento químico em RMN ^{13}C dos carbonos alílicos (δ 34,7 e δ 32,6) com o deslocamento químico dos modelos: 3'(*E*)-decenilbenzeno (δ 34,8 e δ 33,2) e 3'(*Z*)-decenilbenzeno (δ 29,7 e δ 27,8), como mostra a tab. 3, a seguir.

Tabela 3 – Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono alílicos (ppm)

	C – 2'	C – 5'
Modelo <i>E</i>	34,8	33,2
Modelo <i>Z</i>	29,7	27,8
Gibbilimbol B	34,7	32,6
Substância 4	34,7	32,6

Mesmo já tendo sido isolada, nenhuma reação de derivatização foi feita para confirmar a estrutura da substância **4**.

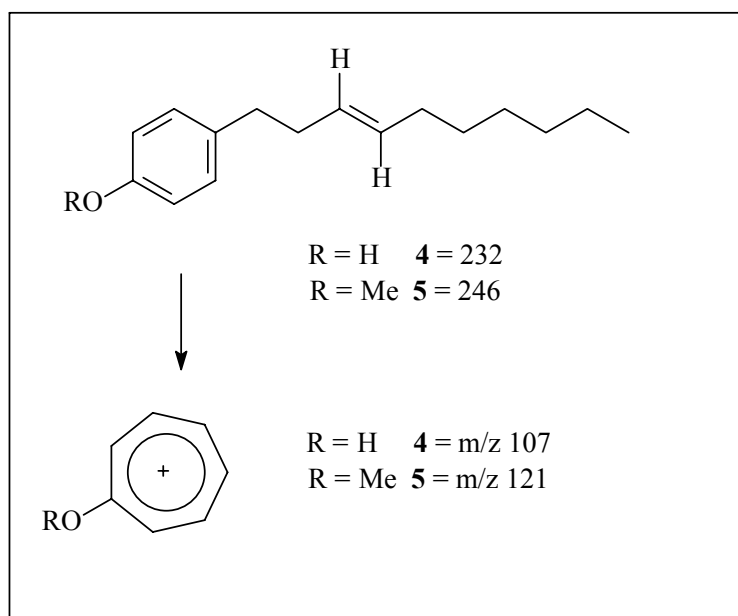
A estrutura do composto **4** não ficou claramente definida utilizando-se os métodos espectroscópicos usuais, RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY e HETCOR:

1. A definição de estereoquímica foi dificultada pela sobreposição dos sinais dos hidrogênios da ligação dupla, impedindo a determinação das constantes de acoplamento - **a amostra foi submetida então à uma reação de epoxidação.**

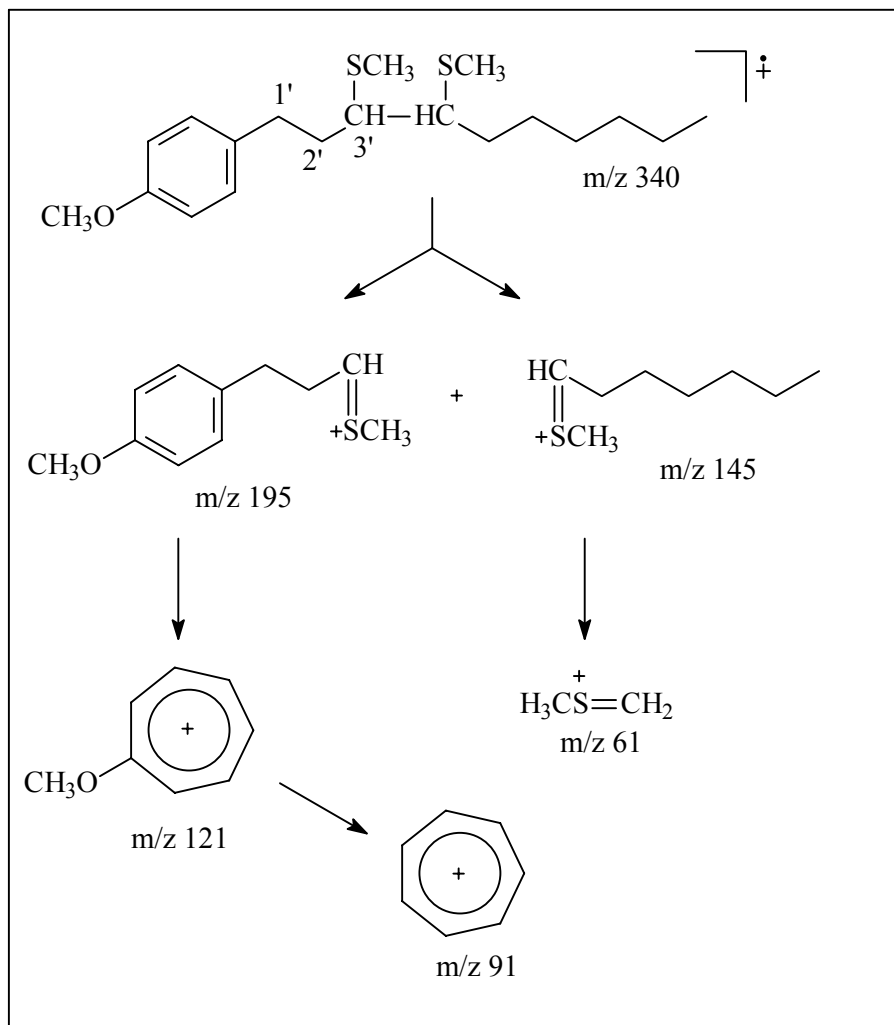
2. A posição da insaturação foi determinada, mas a presença de cadeia alifática com 10 átomos de carbono favorece a possibilidade de que essa atribuição tenha sido feita erroneamente - **fez-se então uma reação com DMDS**.

Todas as reações citadas anteriormente foram acompanhadas por cromatografia gasosa e, para facilitar a análise dessas reações, a substância **4** foi submetida à reações de metilação. Na metilação, foi utilizado solução etérea de diazometano e o resultado não foi satisfatório. Procedeu-se então, a metilação com iodometano em presença de carbonato de potássio e acetona, sob refluxo. Obteve-se o composto **5**, com um bom rendimento, analisado por CG/EM, em cujo espectro verificou-se o pico molecular em m/z 246 e o pico base em m/z 121. Este fragmento se refere a quebra α à ligação dupla, ocorrendo um rearranjo, formando o íon tropílio, conforme esquema **5** e espectro de massas [fig. **32** (Anexo B pág. 124)].

Derivatização com DMDS: conhecidamente utilizada para determinação de posição de ligações duplas, pela formação do di-tio-éter vicinal, que, quando analisado por CG-EM apresenta fragmentações que possibilitam a localização com exatidão da ligação dupla. Esta reação confirmou a ligação dupla na posição 3'. O espectro de massas [fig. **33** (Anexo B pág. 125)], mostrou as fragmentações m/z : $340[M]^+$, 195, 145, 121, 91, 61, conforme esquema **6**.



Esquema **5**: Proposta de fragmentação de massas das substâncias **4** e **5**.



Esquema **6**: Proposta de fragmentações do espectro de massas da substância **5**, após derivatização com DMS.

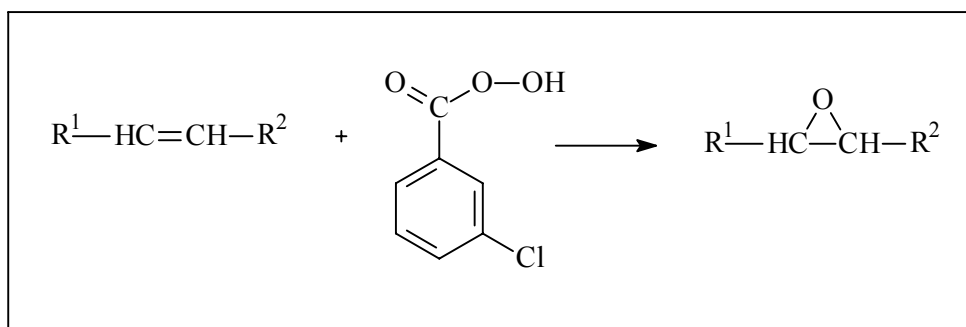
Epoxidação: para definir a estereoquímica da ligação dupla, recorreu-se a reação de epoxidação.

Há várias razões para a importância da formação de epóxidos em compostos com insaturações do tipo $\text{CH}=\text{CH}$. Embora um grande número de isômeros *E*, *Z* na forma $\text{CH}=\text{CH}$ possam ser resolvidos por cromatografia gasosa sobre fase estacionária polar, a separação de isômeros de compostos não polares como alquenos não funcionalizados é algumas vezes difícil. Em contraste, derivados epóxidos de isômeros *E*, *Z* são facilmente resolvidos sobre fase não polar de CG.

Geralmente epóxido *Z* possui maior tempo de retenção do que o isômero *E* e o espectro de massas do epóxido indica a posição da ligação dupla, (Attygalle, 1998).

Além disso, a adição de oxigênio à ligação dupla é necessariamente uma adição *syn*, não modificando a estereoquímica do alqueno inicial e permite uma melhor resolução das constantes de acoplamento entre os átomos de hidrogênio dessa ligação dupla, quando analisados por RMN ^1H .

Embora qualquer perácido possa ser utilizado, o ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) é o reagente mais comumente usado para esta derivatização, (Attygalle, 1998).



Esquema 7: epoxidação com o perácido *m*-CPBA

A reação com *m*-CPBA feita inicialmente como teste (1mg da substância **5**), após 4h não produziu o epóxido esperado. A reação foi refeita, nas mesmas condições, mas utilizando-se outro frasco do perácido *m*-CPBA, após 3h, a reação apresentou resultado satisfatório. Provavelmente o *m*-CPBA utilizado inicialmente, não estava em condições de uso. Após a otimização das condições, procedeu-se a reação com maior quantidade (9 mg da substância **5**).

A formação do epóxido foi confirmado por CG-EM, observando-se o pico molecular em 262 e o pico base em 134 correspondente à fragmentação α ao anel epóxido, típica de éteres saturados cíclicos. Essa fragmentação reforça também a proposta da localização da ligação dupla na posição 3'. É característico também desses compostos a perda de uma molécula de água, neste caso, pico 243.

O epóxido foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C [tab. 14 (Anexo A pág. 103) fig. 34 e 35 (Anexo B pág. 126)], além dos experimentos DEPT 135⁰ e 90⁰, COSY e HETCOR. O espectro de RMN ^1H não apresentou absorção em 5,4 ppm (2H, m), correspondente aos átomos de hidrogênio da ligação dupla (H-3' e H-4') existente na substância 4 [fig. 27 (Anexo B pág. 121)]. Observou-se também, no espectro de RMN ^{13}C , o desaparecimento de sinais em 131,4ppm (C-3') e 129,5 ppm (C-4') referentes aos átomos de carbono da ligação dupla da substância 4 [fig. 28 (Anexo B pág. 121)], e o aparecimento de absorções em 59,2 ppm e em 58,2 ppm, atribuídas aos átomos de carbono oxigenados do epóxido, C-3' e C-4' respectivamente. Esses dados confirmam a formação do epóxido. Observou-se ainda, no espectro de RMN ^1H , sinal em 2,7 ppm (4H, m) que, com auxílio do HETCOR, definiu-se como sendo os átomos de hidrogênio ligados em C-1' (2H), C-3' (1H) e C-4' (1H). Esperava-se que a adição de oxigênio à ligação dupla, permitisse uma melhor resolução das constantes de acoplamento entre os átomos de hidrogênio em C-3' e C-4', mas o fato dos átomos de hidrogênio ligados em C-1', C-3' e C-4' absorverem na mesma região, (2,7 ppm), impediu a definição da estereoquímica da substância 4, através da epoxidação.

Diante dessa observação, considerou-se a estereoquímica da substância 4 como sendo *E*, por comparação com os dados espectroscópicos relatados na literatura (Orjala, 1998), tab. 3 pág. 59.

As folhas de *P. gibbilimbium* são usadas na Nova Guiné, no tratamento de febre, abscessos e ulcerações da pele. O suco obtido das cascas aquecidas e espremidas é tomado para dores internas ou quando há suspeita de câncer (Vyvyan, 2002).

Gibbilimbols A – D (substância 4 = **gibbilimbol B**) foram sintetizadas (Abe, 2001; Vyvyan, 2002) devido à suas propriedades biológicas interessantes e relativa escassez. Orjala (1998), mostra o isolamento de apenas 5,3 mg de **gibbilimbol B**, utilizando 1,2 Kg de folhas secas e pulverizadas. O material vegetal foi sucessivamente percolado com éter de petróleo, CH_2Cl_2 , MeOH e 70% MeOH/ H_2O , a temperatura ambiente. O **gibbilimbol B** foi obtido do extrato éter de petróleo.

No nosso trabalho, a substância 4 foi obtida dos frutos de *P. Gaudichaudianum* na seguinte quantidade:

- a) 30 mg da substância 4, a partir de 22 g de FI secos e pulverizados

b) 41 mg da substância **4**, a partir de 18 g de FM secos e pulverizados, portanto, com um rendimento de aproximadamente 0,18%. Rendimento muito maior, quando comparado ao obtido das folhas de *P. gibbilimum*, $4,4 \times 10^{-4} \%$, conforme dados relatados (Orjala, 1998).

4.1.2 E(CH₂Cl₂)_{fm} – extrato diclorometânico dos frutos maduros

fluxograma **2** página 37

O extrato E(CH₂Cl₂)_{fm}, conforme mostra o fluxograma **2** (pág. **37**), forneceu 3 substâncias identificadas como sendo a cromanona (**2**) – isolado em 2 frações, o derivado fenólico (**4**) e a amida (**3**) – isolada em 2 frações. Todas essas substâncias já haviam sido isoladas no E(CH₂Cl₂)_{fi}, confirmando a semelhança desses extratos.

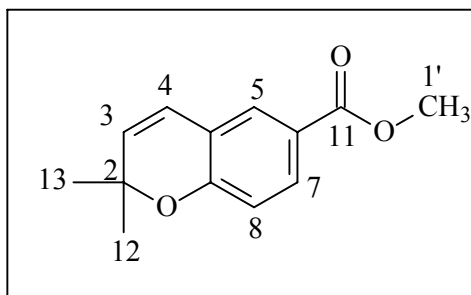
4.1.3 EE_{fi} – extrato etanólico dos frutos imaturos

Fluxograma **3** página 38

O extrato EE_{fi}, conforme mostra o fluxograma **3** (pág. 38), forneceu 3 substâncias, sendo 2 já isoladas nos extratos E(CH₂Cl₂)_{fi} e no E(CH₂Cl₂)_{fm}.

A seguir, a determinação estrutural da substância (**6**).

Determinação Estrutural da Substância 6



A identificação estrutural do composto **6** foi feita com base na análise de seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C [tab. **15** (Anexo A pág. 104) fig. **36 e 37** (Anexo B pág. 127)]. O espectro de RMN ^1H mostra os sinais em 5,6 ppm (H-3; d; $J = 9,9$ Hz), em 6,3 ppm (H-4; d; $J = 9,9$ Hz) e em 1,25 ppm (6H; s), sinais típicos do substituinte 2,2-dimetil cromeno, confirmado pela presença dos sinais em 121,6 ppm (C-3), em 128,0 ppm (C-4), em 28,3 ppm (C-12 e C-13) e em 77,0 ppm (C-2), observados no espectro de RMN ^{13}C . O espectro de RMN ^1H mostra ainda, 3 átomos de hidrogênio em 7,6 ppm (H-5; d; $J = 2,1$ Hz), em 7,8 ppm (H-7; dd; $J = 8,4$ Hz e 2,1 Hz) e em 6,7 ppm (H-8; d; $J = 8,4$ Hz) indicando, pelas constantes de acoplamento (orto e meta), um anel benzênico trissubstituído, cujos deslocamentos químicos dos átomos de carbono, segundo o espectro de RMN ^{13}C e por comparação com os dados da literatura, são respectivamente, 131,06 ppm (C-5), 131,00 ppm (C-7) e 116,1 ppm (C-8). O espectro de RMN ^{13}C mostra também um sinal em 122,0 ppm (C-6), em 157,1 ppm (C-9) e em 120,6 ppm (C-10), todos quaternários atribuídos aos átomos de carbono substituídos do anel benzênico.

Observa-se também uma absorção em 3,8 ppm (3H; s) que está sendo atribuída a uma metoxila cujo carbono absorve em 51,8 ppm, segundo o espectro de RMN ^{13}C .

Finalmente evidencia-se a presença de um sinal no espectro de RMN ^{13}C em 166,8 ppm, atribuído ao carbono de carbonila de um éster (C-11).

A substância **6** mostrou bandas no infravermelho, correspondentes ao anel aromático ($1610, 1490\text{ cm}^{-1}$) e a um grupo éster (1711 cm^{-1}), enquanto que o espectro no ultravioleta [fig. **38** (Anexo B pág. 128)], mostrou três absorções

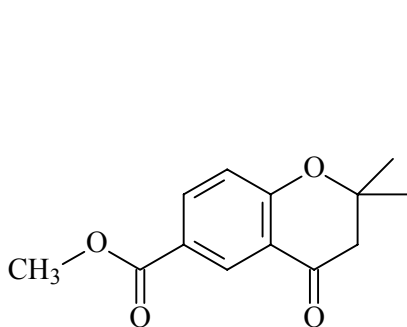
máximas em 271 e 295 nm, sugerindo a presença de um esqueleto cromeno (Scott, 1964).

Todos os dados de RMN ^1H , ^{13}C , IV e UV são coincidentes com a substância 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano 6-carboxilato de metila. Este composto já foi isolado de *P. hostmannianum* (Diaz D., 1987), de *P. aduncum* (Orjala, 1993) e de *P. taboganum* (Roussis, 1990), além de já ter sido sintetizado (Ahluwalia, 1982).

4.2

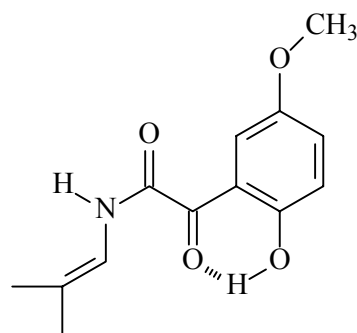
Testes Biológicos

Testes biológicos foram feitos para avaliar a atividade antimicrobiana de algumas das substâncias isoladas e identificadas: **2**, **3**, **4** e **5**.



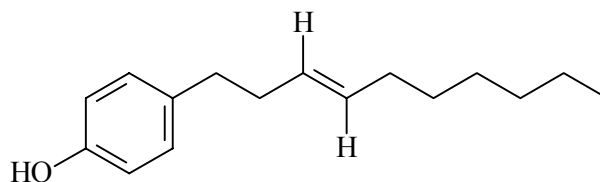
(2)

metil éster de
2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona



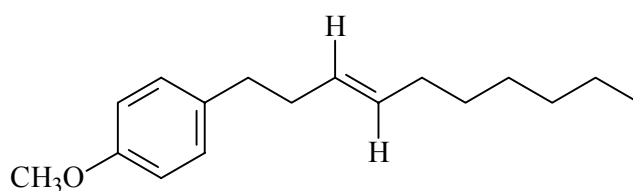
(3)

2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2-
metilpropenil)-2''-oxo-acetamida



(4)

(*E*)-4-(3-decenil) fenol (Gibbilimbol B)



(5)

(*E*)-4-(3-decenil) metoxibenzeno

A faixa de concentração testada foi até 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Atividades positivas acima dessa concentração estariam muito acima da conferida pelos antibióticos padrões utilizados nos testes (cloranfenicol e nistatina).

Em relação aos parâmetros utilizados para avaliação dos resultados de MIC, considerou-se com base no trabalho de Aligiannis et al. (2001), como de forte atividade antimicrobiana, substâncias que apresentaram MIC de até 0,5 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de substâncias isoladas de *P. gaudichaudianum*
– MIC (mg.mL⁻¹)

Microorganismos	Substância 2	Substância 3	Substância 4	Substância 5	Antibiótico Padrão
<i>Bacillus subtilis</i>	Não testado	Não testado	> 1,0	> 1,0	0,02
<i>Candida albicans</i>	Não testado	Não testado	> 1,0	> 1,0	0,05
<i>Enterococcus faecium</i>	Entre 0,5 e 1,0	Entre 0,5 e 1,0	> 1,0	> 1,0	0,07
<i>Escherichia coli</i>	> 1,0	> 1,0	Não testado	Não testado	0,04
<i>Micrococcus luteus</i>	Entre 0,5 e 1,0	Entre 0,5 e 1,0	> 1,0	> 1,0	0,05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Não testado	Não testado	> 1,0	> 1,0	0,85
<i>Rhodococcus equi</i>	> 1,0	> 1,0	0,15	0,20	0,04
<i>Salmonella choterasuis</i>	> 1,0	> 1,0	Não testado	Não testado	0,06
<i>Staphylococcus epidermides</i>	Não testado	Não testado	> 1,0	> 1,0	0,04
<i>Staphylococcus aureus</i>	Não testado	Não testado	> 1,0	> 1,0	0,02
<i>Streptococcus faecium</i>	0,03	0,03/ 0,15	> 1,0	> 1,0	0,12

De acordo com os resultados obtidos, as amostras **2** e **3** se mostraram ativas para *Enterococcus faecium* e *Micrococcus luteus* com valor de MIC entre 0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹. Ambas as amostras foram inibitórias também para *Streptococcus faecium* com valor de MIC de 0,03 mg/mL.

Já as amostras **4** e **5** apresentaram resultado positivo apenas contra *Rhodococcus equi*, com MIC de 0,15 mg.mL⁻¹ (amostra **4**) e 0,20 mg.mL⁻¹ (amostra **5**). Este microrganismo causa pneumonia em cavalos e estudo recente (Figueira,

2003) de atividade antimicrobiana com 40 espécies de plantas provenientes de diversas regiões do Brasil, não demonstraram atividade inibitória para ele.

Diante da dificuldade em se inibir este microrganismo, o resultado de inibição causado pelas substâncias **4** e **5** é muito significativo, incentivando uma continuidade de testes.

4.3

Metabólitos Secundários compostos voláteis

O morcego é um animal de hábito noturno, portanto o consumo de frutos maduros ocorre no período da noite e em função dessa característica, nosso principal interesse está na composição do óleo essencial dos frutos maduros coletados no período da noite. Mas, fez-se também a análise das amostras de frutos coletados nos outros períodos do dia (manhã e tarde) e em estágio de maturação menos avançado (imaturos), para fins de comparação e ajuda na identificação do(s) componente(s) responsável(eis) pela atração do morcego ao fruto.

4.3.1

Metabólitos Secundários compostos voláteis

Métodos de Obtenção do Óleo Essencial

Inicialmente fez-se a **aeração** em campo, dos frutos imaturos e maduros coletados nos períodos, manhã, tarde e noite.

Na **hidrodestilação**, realizada em laboratório, também foram utilizados frutos imaturos e maduros, coletados nos períodos manhã, tarde e noite, que foram mantidos congelados até a sua utilização. Esse segundo método foi utilizado a fim de:

- possibilitar a comparação dos resultados com os obtidos via aeração.
- obtenção de quantidades suficientes de óleo essencial para utilização nos testes de campo.

Diante da dificuldade em se obter frutos maduros em quantidades suficientes para as análises, os frutos prestes a amadurecer foram protegidos com sacos plásticos e tecidos (figuras 4 e 5 págs. 29 e 30), evitando-se dessa forma o ataque dos morcegos e/ou a queda do fruto ao amadurecer.

4.3.1.1 Aeração A: foi dificultada em função da pouca disponibilidade de material vegetal, principalmente dos frutos maduros (2 a 5 frutos por amostra), como também pouco tempo de aeração (1h) acarretando em baixa concentração de óleo essencial, tornando difícil a detecção por CG/EM.

4.3.1.2 Aeração B: visando conseguir resultados mais satisfatórios fez-se uma segunda aeração, com algumas modificações sendo introduzidas. Mudou-se o adsorvente (polímero Super Q ao invés de carvão), o tempo de aeração passou a ser de 4 h por amostra e a quantidade de material vegetal utilizado foi aumentado para 25 g por amostra. As amostras assim obtidas foram analisadas por CG/EM, sendo a identificação dos seus constituintes realizada a partir do espectro de massas em comparação com espectros existentes na literatura, índice de retenção (Adams, 1995; Van del Dol e Kratz, 1964) e Bibliotecas Wiley 138 e NIST 98.

Os resultados da análise qualitativa e quantitativa do óleo essencial dos frutos maduros e imaturos de *P. gaudichaudianum* coletados pela manhã, tarde e noite, obtidos pelos dois métodos, **aeração** e **hidrodestilação**, estão sendo mostrados nas tabelas 16 e 17 (Anexo A págs. 155 e 108 respectivamente). Os cromatogramas estão relacionados nas figuras 39-44, 45-50 (Anexo B págs. 129 a 134 e 135 a 140 respectivamente).

Frutos Imaturos

A análise do óleo essencial dos FI mostrou que existe uma grande semelhança tanto em termos de componentes, quanto de concentração entre as amostras **FI_m**, **FI_t** e **FI_n**. O sabineno e o β -cariofileno estão presentes nas três amostras e em concentrações significativas. O α -humuleno aparece também em concentração significativa nas amostras **FI_t** e **FI_n**. O tricicleno aparece em concentração relativamente alta (16,96%) somente nos **FI_t** e o α -pineno nos **FI_n** (8,81%), [tab. 16 (Anexo A pág. 105) figs. 39-41 (Anexo B págs. 129 a 131)].

Pelo gráfico 1, pode-se observar o perfil destas três amostras de **FI**, verificando grandes semelhanças entre elas, com predominância dos sesquiterpenos hidrocarbonetos, seguidos pelos monoterpenos hidrocarbonetos.

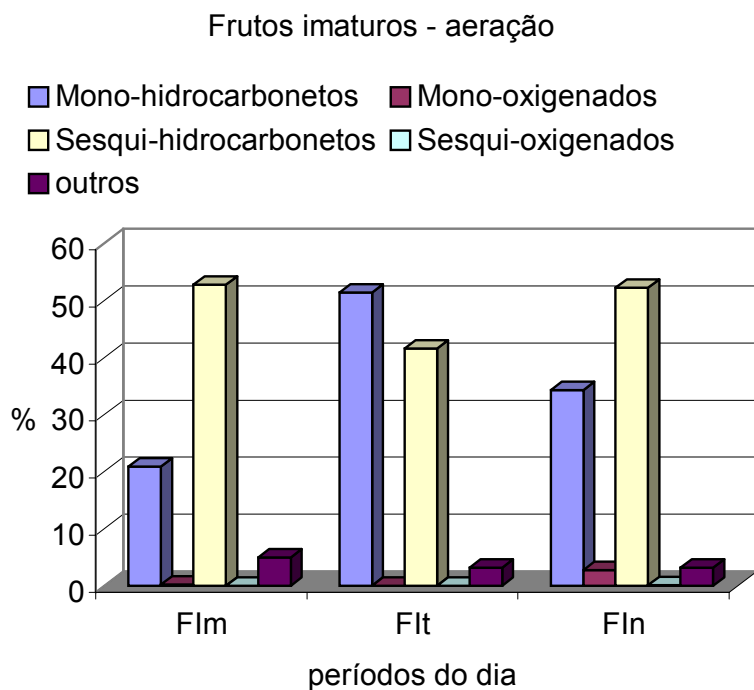


Gráfico 1. Representação dos óleos essenciais dos FI obtidos via aeração

Frutos Maduros

A análise do óleo essencial dos FM mostrou semelhança de componentes, mas diferença na concentração desses componentes, entre as amostras manhã, tarde e noite. A concentração de alguns componentes da amostra **FM_n** chega a reduzir em até um terço em relação a concentração do mesmo componente nas amostras **FM_m** e **FM_t**, [tab. 16 (Anexo A pág. 105) figs. 42-44 (Anexo B págs. 132 a 134)].

Pelo gráfico 2, observa-se relativa semelhança entre as amostras **FM_m** e **FM_t**, com predominância de sesquiterpenos e monoterpênicos hidrocarbonetos. A grande diferença está na amostra **FM_n**, onde tem-se a ocorrência de um componente majoritário, o éster bis-2-etilhexil do ácido hexanodióico, em uma concentração de 68,92%, incluído no grupo de componentes denominados **outros**.

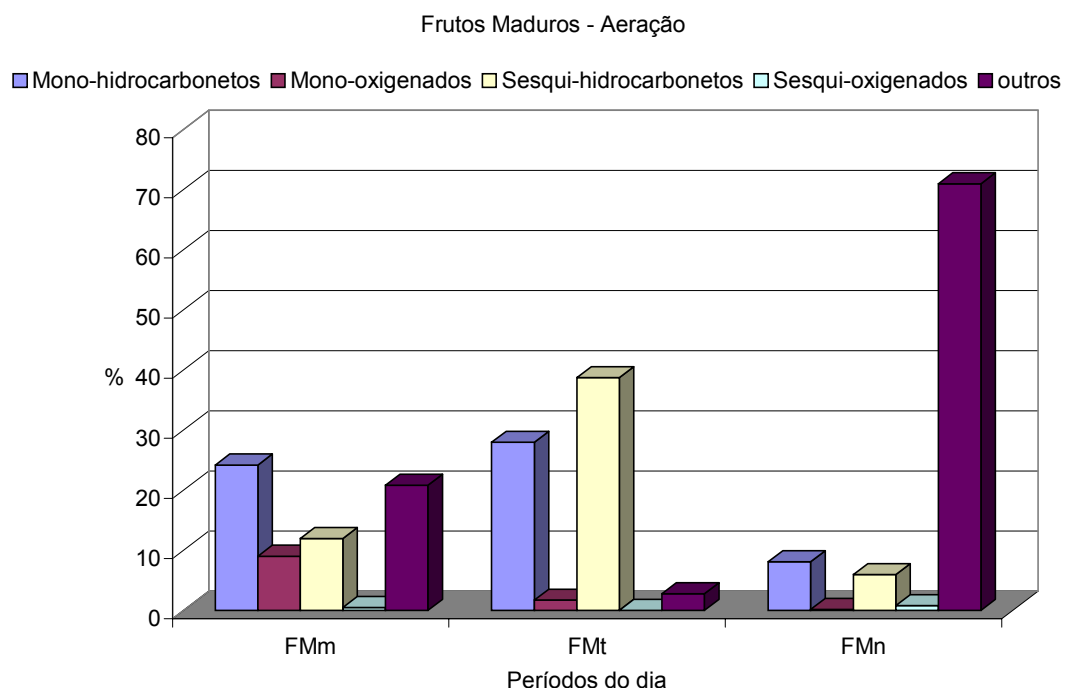


Gráfico 2. Representação dos óleos essenciais dos FM obtidos via aeração

Frutos Imaturos e Maduros

As amostras de óleo essencial obtidas via aeração dos frutos imaturos e maduros quando analisadas como um todo, indicam predominância dos sesquiterpenos hidrocarbonetos, seguido dos monoterpenos hidrocarbonetos.

Essa observação está evidenciada no gráfico 3 abaixo.

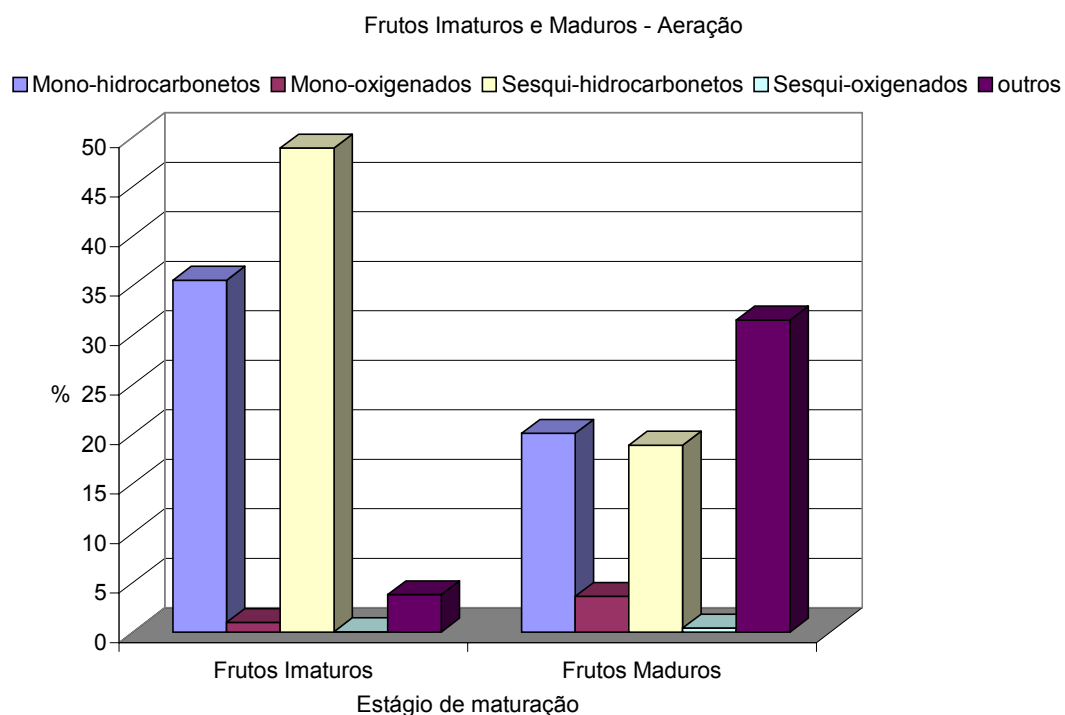


Gráfico 3. Comparação dos óleos essenciais dos FI e FM obtidos via aeração

Observa-se que alguns componentes estão presentes em praticamente todas as amostras em concentrações consideráveis como o sabineno, o β -cariofileno, α -humuleno, além de outros em menores concentrações como o limoneno, o (E) β -ocimeno e o α -copaeno.

Comparando as amostras, percebemos uma nítida diferença, principalmente de concentração entre os componentes do óleo essencial dos frutos imaturos e dos

frutos maduros. Mais que isso, a concentração dos componentes de uma maneira geral, vai sendo reduzida, a medida que o fruto amadurece. Ele atinge seu último estágio de amadurecimento no período noturno. E, na amostra de **FM_n**, as concentrações dos principais componentes do óleo essencial são reduzidas ou inexistentes, surgindo um componente majoritário, com 68,92%. O éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodióico, identificado pela biblioteca do espectrômetro de massas.

Avaliando a possibilidade de ser este o componente principal na atratividade do morcego ao fruto maduro, fez-se sua síntese simétrica. Dessa forma, seria possível a confirmação da estrutura proposta, bem como a obtenção deste componente puro, para posterior teste de campo. O produto foi submetido à análise por CG-EM e apresentou as fragmentações m/z : 371[M]⁺⁺, 259, 147, 129, 111, 83, 70, 56, 41. O espectro de massas do éster sintético quando comparado ao espectro de massas do componente majoritário detectado na amostra de óleo essencial **FM_n**, apresenta as mesmas fragmentações, além de tempo de retenção no CG ser o mesmo. A síntese confirma desta forma, a estrutura inicialmente proposta para o composto majoritário. O éster então obtido, foi submetido a teste de campo preliminar, (experimento 4, tab. 9, pág. 87).

Hidrodestilação

As amostras obtidas por hidrodestilação foram analisadas da mesma forma que as obtidas por aeração. Os resultados estão relacionados na tab.17 (Anexo A pág. 108).

Frutos Imaturos

A análise do óleo essencial dos frutos imaturos mostrou que existe uma grande semelhança tanto de componentes quanto de concentração entre as

amostras manhã, tarde e noite. O α -humuleno, o δ -cadineno, o óxido de cariofileno e o α -cadinol, aparecem em concentrações significativas nas 3 amostras. Já a fenchona, o E-nerolidol, o espatulenol e o epóxido de humuleno II aparecem em concentrações consideráveis nos **FI_t** e **FI_n** e o β -cariofileno nos **FI_m** e **FI_n**, [tab. 17 (Anexo A pág. 108) figs. 45-47 (Anexo B págs. 135 a 137)].

Pelo gráfico 4 a seguir observa-se que as amostras **FI_m**, **FI_t** e **FI_n**, são constituídas essencialmente por sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados.

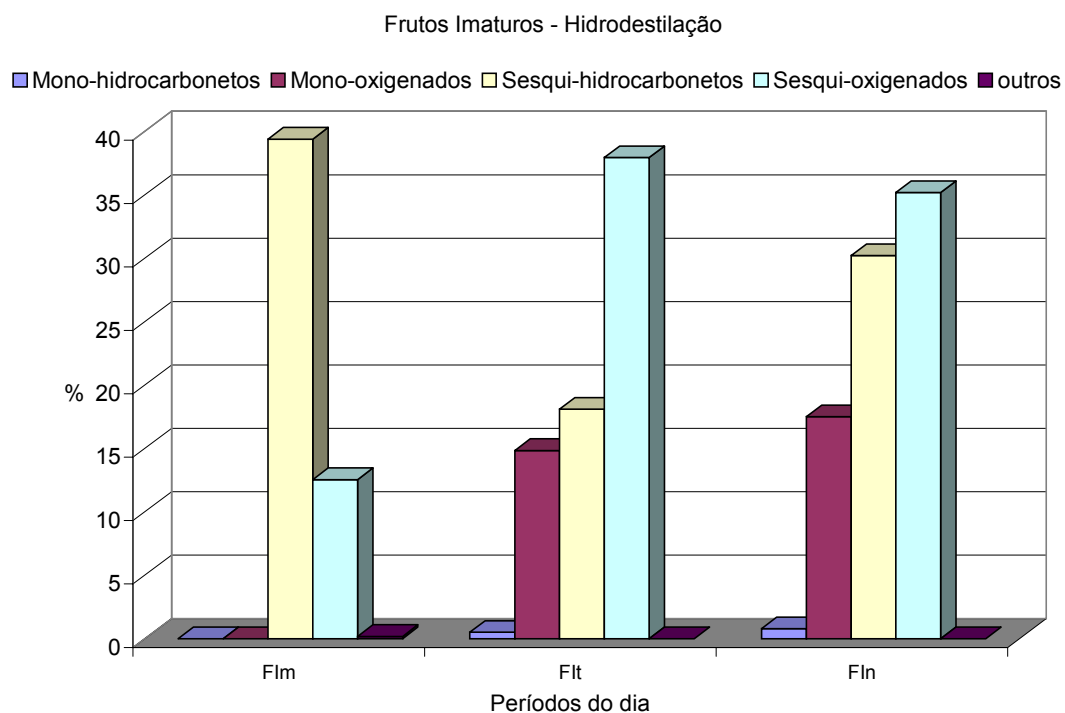


Gráfico 4. Representação dos óleos essenciais dos FI obtidos via hidrodestilação

Frutos Maduros

A análise do óleo essencial dos frutos maduros mostrou semelhança tanto de componentes quanto de concentrações desses componentes, entre as amostras

manhã, tarde e noite. Os componentes presentes nas 3 amostras com valores significativos de concentrações são: β -cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno e óxido de cariofileno, [tab. 17 (Anexo A pág. 108) figs. 48-50 (Anexo B pág. 135 a 140)].

A análise do gráfico 5 abaixo mostra que há uma predominância de sesquiterpenos hidrocarbonetos seguida de sesquiterpenos oxigenados nas amostras **FM_m**, **FM_t** e **FM_n**.

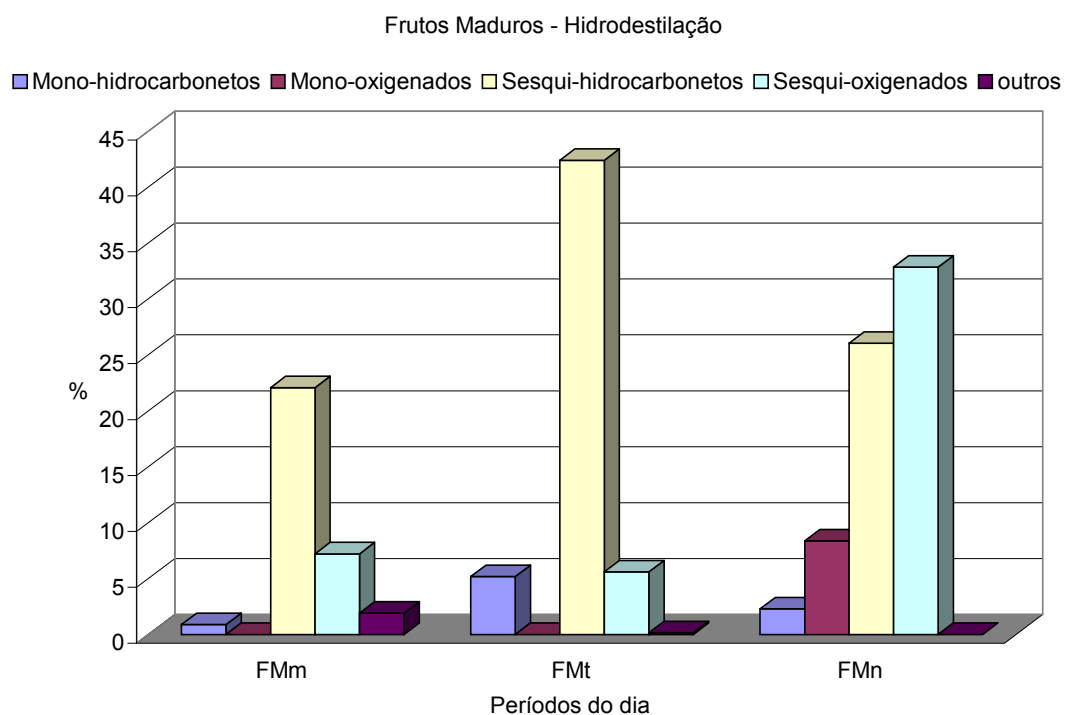


Gráfico 5. Representação dos óleos essenciais dos FM obtidos via hidrodestilação

Frutos Imaturos e Maduros

A análise como um todo das amostras de FM e FI obtidas por hidrodestilação indica predominância de sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados, como pode-se observar pelo gráfico 6 a seguir.

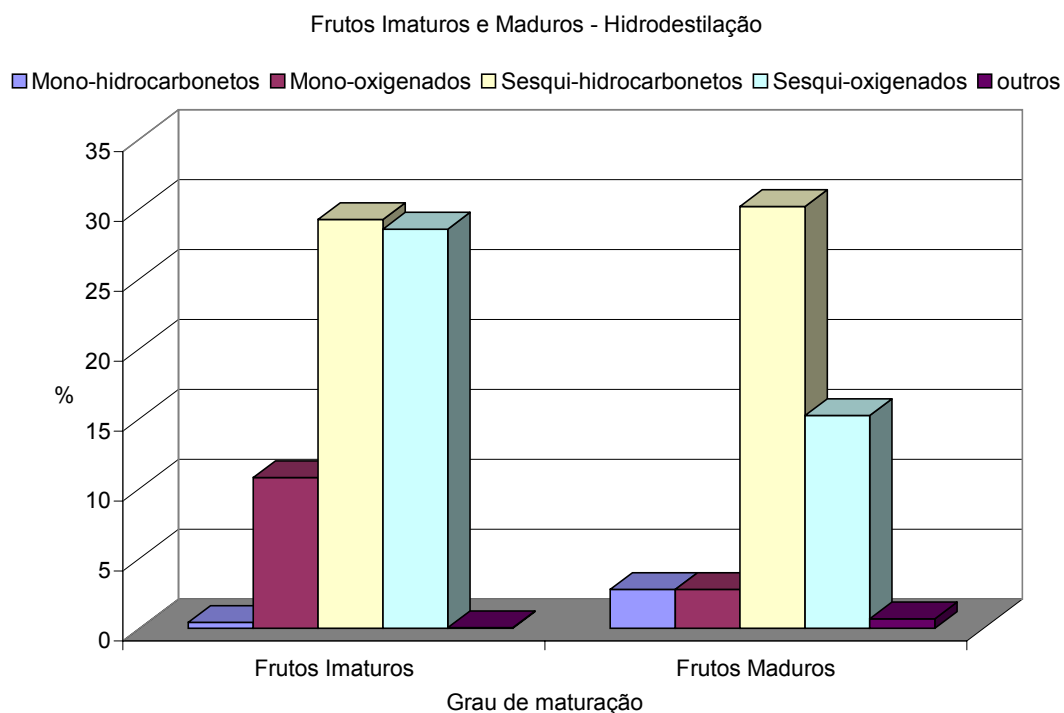


Gráfico 6. Comparação dos óleos essenciais dos FI e FM obtidos via hidrodestilação

Aeração X Hidrodestilação

A hidrodestilação foi feita a fim de se obter a quantidade de óleo essencial necessária para a realização dos testes de campo, visto que, a quantidade obtida via aeração não era suficiente.

Mas, após análise por CG/EM das amostras assim obtidas, verificou-se que haviam nítidas diferenças quando comparadas com as amostras obtidas via aeração.

Ao comparar-se as duas técnicas observou-se que os componentes identificados via aeração foram basicamente monoterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos hidrocarbonetos, enquanto que via hidrodestilação, além da presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos, foram identificados monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados, componentes que na aeração eram

inexistentes ou apresentaram concentrações reduzidas. Essa comparação está sendo evidenciada no gráfico 7 a seguir.

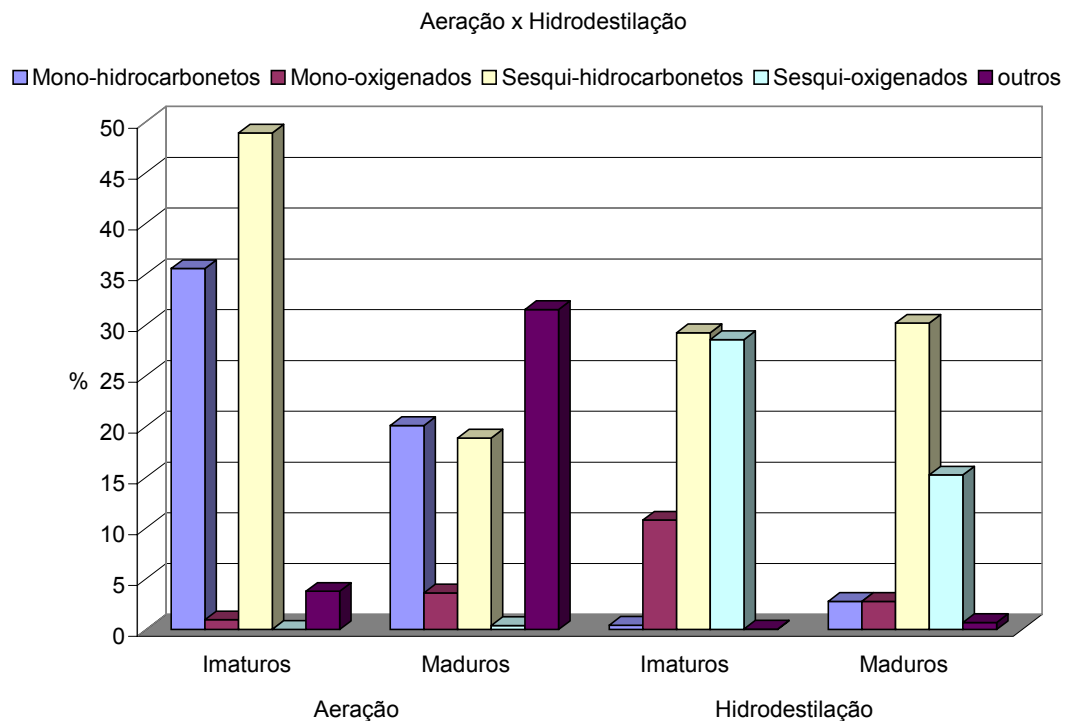


Gráfico 7. Comparação dos óleos essenciais obtidos via aeração e hidrodestilação

O componente β -cariofileno estava presente em quantidades consideráveis em praticamente todas as amostras (**FI** e **FM**), tanto na hidrodestilação como na aeração. Já os componentes α -copaeno, γ -muuroleno e δ -cadineno estão presentes também em praticamente todas as amostras (**FI** e **FM**), na hidrodestilação e na aeração, mas em pequenas concentrações.

O componente *E*-nerolidol foi detectado em quantidades consideráveis em praticamente todas as amostras (**FI** e **FM**), obtidas por hidrodestilação e os componentes óxido de cariofileno, espatulenol e α -cadinol, em quantidades reduzidas.

O componente sabineno foi encontrado em todas as amostras analisadas (**FI** e **FM** obtidos por aeração) em concentrações consideráveis; e o triciclono (16,96%) na amostra **FI_t**, o α -pineno (8,81%) na amostra **FI_n**. O limoneno e o (*E*) β -ocimeno foram detectados em praticamente todas as amostras (**FI** e **FM** obtidas por aeração), em concentrações reduzidas.

A análise da amostra **FM_n**, obtida por aeração acusou a presença de um componente majoritário, o éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodióico, numa concentração de 68,92%. É importante observar que este éster está presente também na amostra **FM_m** (17,66%) e, em concentração reduzida na amostra **FM_t**.

Como é intenção deste trabalho verificar a atratividade dos óleos essenciais em relação ao morcego frugívoro, realizou-se testes de campo utilizando o óleo essencial **FM_n** obtidos por hidrodestilação (Experimentos 1-3) e o componente majoritário do óleo **FM_n** obtido por aeração. Vale ressaltar que esta é a primeira vez que se realiza testes de atratividade com morcegos utilizando as condições naturais. A literatura relata poucos testes feitos em laboratório.

4.3.2

Metabólitos Secundários compostos voláteis

Testes de Campo

Os testes de campo em condições naturais tiveram algumas dificuldades: inexistência de metodologias específicas já relatadas, necessidade de programação dos testes de acordo com condições climáticas favoráveis (períodos não chuvosos, lua nova, temperaturas amenas), movimento migratório dos morcegos ainda desconhecido, existência de recursos no local de testes, além de dificuldades inerentes ao ambiente e ao horário em que foram feitos os testes.

Considerando que a quantidade de extrato bruto obtido na hidrodestilação dos frutos maduros foi muito maior do que a obtida na aeração destes, iniciou-se os testes de campo com esta amostra.

Três testes de campo utilizando o óleo essencial bruto foram feitos. Os resultados desses testes estarão sendo discutidos a seguir e estão relatados no artigo Mikich et al., 2003.

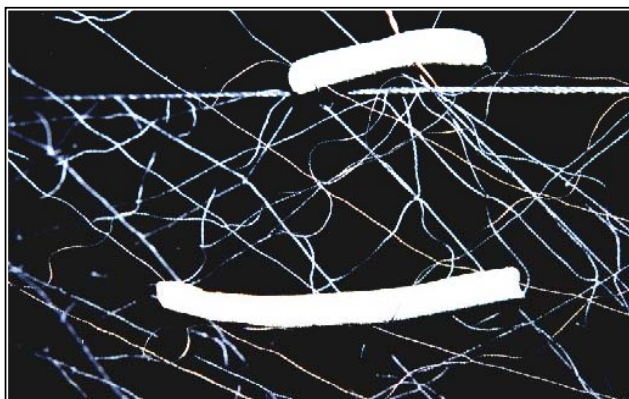


Figura 9. Fruto – isca preso a rede de neblina

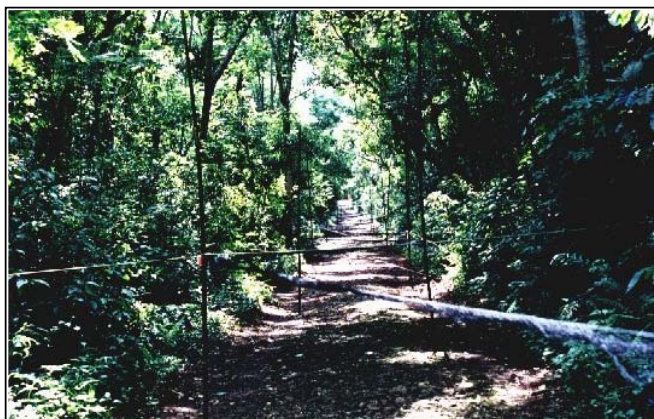


Figura 10. Redes de neblina dispostas em zigue-zague no PEVR



Figura 11. Morcego *Sturnira lilium* capturado em teste de campo - PEVR

Experimento 1

Foram capturados em redes de neblina 16 morcegos frugívoros e um insetívoro, em 4 noites consecutivas de teste. Conforme observa-se na tabela 5, morcegos da espécie *C. perspicillata* e *S. liliun* foram capturados em sua totalidade em redes pares, as quais continham “frutos iscas” impregnados com o óleo essencial. Morcegos da espécie *A. lituratus* foram capturados aleatoriamente em redes pares (33,3%) e ímpares (66,7%). Foram realizadas análises das sementes presentes nas fezes de todos os morcegos capturados, observando-se que as fezes das espécies *C. perspicillata* e *S. liliun* continham sementes de Piperaceae. Já nas fezes de *A. lituratus* foram encontradas sementes de outras famílias.

Tabela 5 – Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas – Experimento 1

Morcegos capturados (%)				
Espécie	Redes pares		Redes ímpares	
	%	n	%	n
<i>Carollia perspicillata</i>	100%	02	-	0
<i>Sturnira liliun</i>	100%	05	-	0
<i>Artibeus lituratus</i>	33,3%	03	66,7%	06
Total de morcegos capturados		16		

Redes pares: redes com “frutos iscas” impregnados com óleo essencial FM de *P. gaudichaudianum*

Redes ímpares: redes com “frutos iscas” não impregnados com óleo essencial

n: número de morcegos capturados

Experimento 2

No experimento 2 foram capturados 14 morcegos frugívoros, em 4 noites consecutivas de testes. Podemos observar pela tabela 6, que morcegos da espécie *C. perspicillata* foram capturados exclusivamente em redes pares. Morcegos da espécie *S. liliun* e *Chrotopteros auritus* somente em redes ímpares. Morcegos da espécie *A. lituratus* foram capturados aleatoriamente em redes pares e redes ímpares, um morcego da espécie *Phyllostomus hastatus* foi capturado em rede par. Análises das sementes presentes nas fezes dos morcegos capturados foram realizadas e, sementes de Piperaceae foram encontradas apenas nas fezes de *C. perspicillata*. Nas fezes dos demais morcegos foram encontradas sementes de outras famílias.

Tabela 6 – Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas – Experimento 2

Morcegos capturados (%)				
Espécie	Redes pares		Redes ímpares	
	%	n	%	n
<i>Carollia. perspicillata</i>	100%	07	-	0
<i>Sturnira liliun</i>	-	0	100%	03
<i>Artibeus lituratus</i>	50%	01	50%	01
<i>Chrotopteros auritus</i>	-	0	100%	01
<i>Phyllostomus hastatus</i>	100%	01	-	0
Total de morcegos capturados		14		

Redes pares: redes com “frutos iscas” impregnados com óleo essencial FM de *P. gaudichaudianum*

Redes ímpares: redes com “frutos iscas” não impregnados com óleo essencial

n: número de morcegos capturados

Experimento 3

Foram capturados 75 morcegos frugívoros também em 4 noites consecutivas de testes. A tabela 7 mostra o percentual de capturas, 70,5% dos morcegos da espécie *C. perspicillata* foram capturados em redes pares e 29,5% em redes ímpares. A totalidade dos morcegos da espécie *S. lilium* foram capturados em redes ímpares. Já morcegos das espécies *A. lituratus*, *A. fimbriatus* e *A. sp.*, foram capturados aleatoriamente, 51,7% em redes pares e 48,3% em redes ímpares. Da mesma forma que nos experimentos anteriores, foram feitas análises das sementes das fezes dos morcegos capturados. Sementes de Piperaceae foram encontradas apenas nas fezes de morcegos da espécie *C. perspicillata*. Nas fezes das outras espécies foram encontradas sementes de outras famílias.

Tabela 7 – Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas – Experimento 3

Morcegos capturados (%)				
Espécie	Redes pares		Redes ímpares	
	%	n	%	n
<i>Carollia perspicillata</i>	70,5%	12	29,5%	05
<i>Sturnira lilium</i>	-	0	100%	02
<i>Artibeus lituratus</i> , <i>A. fimbriatus</i> e <i>A. sp.</i>	51,7%	29	48,3%	27
Total de morcegos capturados		75		

Redes pares: redes com “frutos iscas” impregnados com óleo essencial FM de *P. gaudichaudianum*

Redes ímpares: redes com “frutos iscas” não impregnados com óleo essencial

n: número de morcegos capturados

Experimentos 1, 2 e 3

A tabela 8 apresenta o resultado dos três experimentos, totalizando 105 morcegos capturados. Morcegos da espécie *C. perspicillata* foram capturados em sua maioria (80,7%) em redes pares e, 19,3% em redes ímpares. Já as demais espécies de morcegos foram capturadas aleatoriamente: *S. liliun*, 50% em redes pares e 50% em redes ímpares; *A. lituratus*, *A. fimbriatus* e *A. sp.*, 49,2% em redes pares e 50,8% em redes ímpares; *C. auritus*, um morcego capturado em rede ímpar e *P. hastatus*, um morcego capturado em rede par.

Tabela 8 – Espécies e porcentagens de todos os morcegos capturados nos experimento 1, 2 e 3

Morcegos capturados (%)				
Espécie	Redes pares		Redes ímpares	
	%	n	%	n
<i>Carollia perspicillata</i>	80,7%	21	19,3%	05
<i>Sturnira liliun</i>	50%	05	50%	05
<i>Artibeus lituratus</i> , <i>A. fimbriatus</i> e <i>A. sp.</i>	49,2%	33	50,8%	34
<i>Chrotopteros auritus</i>	-	0	100%	01
<i>Phyllostomus hastatus</i>	100%	01	-	0
Total de morcegos capturados		105		

Redes pares: redes com “frutos iscas” impregnados com óleo essencial FM de *P. gaudichaudianum*

Redes ímpares: redes com “frutos iscas” não impregnados com óleo essencial

n: número de morcegos capturados

Experimento 4

Não foram testadas amostras de óleo obtidas por aeração, devido sua pouca quantidade. Mas considerando que esta é a técnica que reproduz com mais fidelidade as condições do ambiente onde se encontra o fruto e o morcego, sintetizou-se o éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodióico. Este composto está presente apenas nos FM e em alta concentração na amostra FM_n (68,92%).

Este componente foi sintetizado e testado puro em campo, nas mesmas condições e no mesmo local dos testes utilizando o óleo essencial (extrato bruto) como atrativo. Este éster possui dois centros estereogênicos, originando os estereoisômeros (2'R, 2'R), (2'S, 2'S) e (2'R, 2'S) e, a amostra utilizada em campo, no teste preliminar, foi a mistura estereoisomérica (produto da síntese simétrica). Observou-se a captura de 57,8% de morcegos *C. perspicillata* em redes pares e de 42,2% em redes ímpares (os resultados deste teste estão relacionados na tab. 9).

Não há relatos de estudos da interação química de plantas com morcegos (sinônimo), portanto nada sabe-se da sensibilidade e seletividade do olfato do morcego à estereoisômeros. E, a pequena diferença de 15% de atratividade em relação ao *C. perspicillata* neste teste preliminar indica que, caso o éster esteja envolvido no mecanismo de atração dos morcegos, não atua como único componente.

Tabela 9 – Espécies e porcentagens de morcegos capturados em 4 noites consecutivas utilizando o éster bis (2-etilexil) do ácido hexanodióico – Experimento 4

Morcegos capturados (%)				
Espécie	Redes pares		Redes ímpares	
	%	n	%	n
<i>Carollia perspicillata</i>	57,8%	11	42,2%	08
<i>Sturnira lilium</i>	42,8%	09	57,2%	12
<i>Artibeus lituratus</i> , A. <i>fimbriatus</i> e A. sp.	46,7%	14	53,3	16
Total de morcegos capturados		70		

Redes pares: redes com “frutos iscas” impregnados com óleo essencial FM de *P. gaudichaudianum*

Redes ímpares: redes com “frutos iscas” não impregnados com óleo essencial

n: número de morcegos capturados

Estes resultados positivos com óleo essencial **FM_n** – hidrodestilação, evidenciam que *C. perspicillata* utiliza o **olfato** como forma de localizar os frutos maduros de *Piper*.

Surge portanto, a seguinte questão: qual ou quais componentes são os responsáveis por esta atração?

Ou de uma forma mais ampla:

- Compostos voláteis presentes apenas nos frutos maduros são os responsáveis pela atração?
- A variação quali e quantitativa dos voláteis em frutos maduros em

função do período do dia é proposital para a atração dos morcegos?

A amostra de óleo **FM_n** – hidrodestilação testada, apresenta apenas dois compostos específicos, ou seja, que foram identificados apenas nela: linalol e viridifloreno. Testes de campo com estes componentes puros e/ou em mistura serão necessários. Todos os outros voláteis presentes nesta amostra também estão presentes em uma ou mais amostras de FI.

Considerando que a técnica de aeração reproduz com mais fidelidade o ambiente natural, foi inesperado o resultado de não atratividade do componente majoritário do óleo **FM_n** – aeração. Analisando os compostos específicos desta amostra, observou-se que possui apenas dois, em concentrações muito reduzidas (<1%): isosilvestreno e n-propanoato de geranila. Os compostos mirceno, hidrato de trans-sabineno, n-hexadecano, n-heptadecano e n-eicosano estão presentes na amostra de **FM_n** e nas amostras **FM_m** e/ou **FM_t**. Destes compostos, apenas o mirceno e o n-hexadecano, ocorrem respectivamente nas amostras **FM_t** e **FM_m** obtidas por hidrodestilação.

Não é observado uma co-ocorrência significativa de componentes, nos óleos obtidos por aeração e hidrodestilação

Este trabalho químico é pioneiro na tentativa de elucidar o mecanismo de interação entre frutos e morcegos. As variações químicas observadas nas amostras de óleo essencial estudadas, são um indicativo da complexidade envolvida na atração dos morcegos pelos frutos maduros de *Piper gaudichaudianum*.

5

Conclusão

A compreensão do aspecto químico da relação entre planta (*P. gaudichaudianum*) e morcego frugívoro (*C. perspicillata*), foi o direcionamento deste trabalho.

Dentro desse contexto, foram isoladas e identificadas cinco substâncias não voláteis, sendo uma delas inédita como produto natural, ressaltando que o estudo fitoquímico de *P. gaudichaudianum* é inédito.

O estudo dos voláteis foi feito utilizando dois métodos de extração: aeração (em campo) e hidrodestilação (em laboratório). Fez-se uma análise circadiana (manhã, tarde e noite) das amostras obtidas de óleo essencial dos frutos imaturos e maduros de *P. gaudichaudianum*, totalizando doze amostras. A partir dessa análise, evidenciou-se variações químicas entre as amostras de óleo essencial, apontando para a complexidade envolvida na atração do morcego ao fruto maduro de Piper.

Testes de campo foram realizados com amostras de óleo essencial bruto e um componente sintetizado. O primeiro (óleo essencial bruto) apresentou um resultado positivo de 80,7 % de atratividade. Este resultado é muito importante sob dois aspectos:

1. demonstra que o morcego *C. perspicillata* é guiado até os frutos maduros de *Piper* pelo olfato.
2. testes de campo são conhecidamente realizados **reproduzindo** o ambiente natural e, sob o aspecto biológico. Neste trabalho, os testes foram conduzidos **no ambiente natural dos morcegos**.

O pioneirismo deste trabalho é evidenciado pela inexistência de estudos que tratam de ecologia química de mamíferos. Este trabalho poderá viabilizar a utilização do óleo essencial como uma técnica de regeneração natural induzida que potencializa o serviço da fauna nativa como dispersora de sementes. Esta técnica se constitui no uso de óleos essenciais de frutos maduros para a atração de morcegos frugívoros.

Abre-se, portanto, possibilidades de encaminhamento de estudos com diferentes espécies quiropterocóricas de Piper, Ficus e Solanum em áreas abertas, florestas ou campos cultivados.

6

Referências Bibliográficas

- Abe, Y.; Takikawa, H.; Mori, k. 2001. Synthesis of gibbilimbols A – D, cytotoxic and antibacterial alkennyphenols isolated from *Piper gibbilimum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(3):732-735.
- Adams, R.P. 1995. Identificacion of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Carol Stream, Illinois, Allured Publishing Corporation.
- Agrawal, P. K.; Rastogi, R. P. 1981. ^{13}C NMR spectroscopy of flavonoids. *Heterocycles*, 16(12):2181-2236.
- Bizerril, M.X.A.; Raw, A. 1997. "Feeding Specialization of two Species of Bats and the Fruit Quality of *Piper arboreum* in a Central Brazilian Gallery Forest" *Revista Biologia Tropical*, 45 (2):913-918.
- Bizerril, M.X.A.; Raw, A. 1998. "Feeding behaviour of Bats and the Dispersal of *Piper arboreum* seeds in Brazil" *J. Trop. Ecology*, **14**(1): 109-114.
- Burke, B.; Nair M. 1986. Phenilpropene, Benzoic Acid and Flavonoid Derivatives from Fruits of Jamaican *Piper* Species. *Phytochemistry*, **25**(6): 1427-1430.
- Charles-Dominique, P. 1986. Inter.-Relations between Frugivorous Vertebrates and Pioneer Plants: *Cecropia*, Birds and Bats in French Guiana. pp. 119-134, In: Estrada, A. e T.H. Fleming (eds.), *Frugivores and Seed Dispersal*. Dordrecht, W. Junk Publishers.
- Dewick, P. M. 1998. *Medicinal Natural Products*. Other Wiler Editorial Offices, New York.
- Deutsches Arzneibuch 10 (farmacopéia alemã DAB 10). 1991. Gehaltsbestimmung des átherischen Oles in Drogen. *Grudlfg.* Vol **1**, V. 4.5.8.

- Ferreti, A. P. M. e A. C. S. Medeiros (eds.), *Restauração da Mata Atlântica em Áreas de sua Primitiva Ocorrência Natural*. Editora
- Fleming, T.H.; Heithaus E.R. 1981. Frugivorous Bats, Seed Shadows, and the Structure of Tropical Forests. *Biotropica* [Suppl.], **13**: 45-53.
- Fleming, T.H. 1986. Opportunism versus Specialization: the Evolution of Feeding Strategies in Frugivorous Bats. pp. 105-118, In: Estrada, A. e T. H. Fleming (eds.), *Frugivores and Seed Dispersal*. Dordrecht, W. Junk Publishers.
- Fleming, T.H. 1988. *The short-tailed fruit bat: a study in plant-animal interactions*. Chicago, University of Chicago Press.
- Gorchow, D.L.; Cornejo, F.; Jaramillo, M. 1993. Dietary overlap between frugivorous birds and bats in the Peruvian Amazon. *Oikos*, **74**: 235-250.
- Gupta, M. P.; Arias, T. D.; Williams, N. H.; Bos, R.; Tattje, D. H. E. 1985. Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. *Journal of Natural Products*, **48**(2): 330.
- Harbone, J.B. 1993. *Introduction to ecological biochemistry* Academic Press, 4º ed.
- Heithaus, E. R.; Fleming, T. H. 1978. Foraging movements of a frugivorous bat, *Carollia perspicillata* (Phyllostomatidae). *Ecological Monographs*. **48**:127-143.
- Howe, H.F. 1984. Implications of seed dispersal by animals for tropical reserve management, *Biological Conservation*, **30**: 261-281.
- Jaramillo, M.A.; Manos, P. S. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, **88** (4):706-716.
- Kéita, S.M.; Vincent, C.; Schmit, J-P.; Ramaswami, S.; Bélanger, A. 2000. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, **36**:355-364.
- Kinghorn, A.D. 1987. Biologically Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties. *J. Nat. Prod.*, **50** (6): 1009-1024.
- Klayman, D.L. 1985. Qinghoau: An Antimalarial Drug from China. *Science*, **228** (5): 1049-1055.

- Koay, G.; Heffner, R. S.; Bitter, K. S.; Heffner, H. E. 2003. Hearing in American leaf-nosed bats. II: *Carolina perspicillata*. *Hearing Research*, **178**: 27-34.
- Laurance, W. F.; Bierregaard, R.O.. Jr. (eds). 1997. Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities. Chicago, University of Chicago Press.
- Lazarini, C. E.; Ribeiro, J. P.; Cavalcante de Souza, R. P. R.; Balbino, V. K. 2001. Recuperação da vegetação de Matas de Galeria: estudos de caso no Distrito Federal e entorno. pp. 815-817, In: Bibeiro, J. P.; Lazarini, C. E.; Souza-Silva, J. C. (eds.), Cerrado: caracterização e recuperação de matas de Galeria. Planaltina, Embrapa Cerrados.
- Lê-Van, N.; Pham, T. V. C. 1981. An unusual m-hydroxiacetophenone and three new chromanone derivatives from *Chysothamnus viscidiflorus*. *Phytochemistry*, **20**: 485-487.
- Mabry, Y.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B. 1970. The Systematics Identification of Flavonoids. N.Y., Springer – Verlag.
- Mackenzie, A. R.; Moody, C. J.; Rees, C. W. 1986. Synthesis of the bacterial coenzyme methoxatin. *Tetrahedron*, **42**(12): 3259-3268.
- Mann, J. 1987. Secondary Metabolism. Oxford /university Press, Oxford. 2ed.
- Marinho-Filho, J.S. 1991. The coexistence of two frugivorous bat species and the of their food plants in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, **7**(1): 59-67.
- MMA. 2000. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília. MMA/SBF.
- Moreira, D. L.; Kaplan, M. A. C.; Guimarães, E. F. 1998. Essential oil analysis of two Piper species (Piperaceae). *An. Acad. Bras. Ci.*, **70**(4): 751-754.
- Moreira, D. L.; Souza, P. O. Kaplan, M. A. C.; Pereira, N. A.; Cardoso, G. L.; Guimarães, E. F. 2001. effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C. DC. In Mice behaviour. *An. Acad. Bras. Ci.*, **73**(1): 33-37
- Muller, M. F.; Reis, N.R. 1992. Partição de recursos alimentares entre quatro espécies de morcegos frugívoros (Chiroptera, Phyllostomidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **9** (3-4): 345-355.

- Mundina, M.; Vila, R.; Tomi, F.; Gupta, M. P.; Adzet, T.; Casanova, J.; Cañigueral, S. 1998. Leaf essential oils of three panamanian *Piper* species. *Phytochemistry*, **47**(7): 1277-1282.
- Mundina, M.; Vila, R.; Tomi, F.; Tomás, X.; Cicció, J. F.; Adzet, T.; Casanova, J.; Cañigueral, S. 2001. Composition and chemical polymorphism of the essential Oil from *Piper lanceaefolium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**: 739-748
- Orjala, J.; Mian, P.; Rali, T.; Sticher, O. 1998. Gibilimbols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Piper gibbilimum*. *J. Nat. Prod.* 61:939-941.
- Palmeirim, J.M.; Gorchow, D.L.; Stoleson, S. 1989. Trophic structure of a neotropical frugivore community: is there competition between birds and bats? *Oecologia*, **79**: 403-411.
- Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K.; Jain, S. R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. 1997. Phytochemistry of the Genus *Piper*. *Phytochemistry*, **46**(4): 597-673.
- Plano de Manejo – Parque Estadual Rica do Espírito Santo (PEVR). 1987.
- Roussis, V.; Stephen, A. A.; David, F.W. 1990. A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry*, **29**(6): 1787-1788.
- Santos, P. R. D.; Moreira, D. L.; Guimarães, E. F.; Kaplan, M. A. C. 2001. Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*, **58**: 547-551.
- Scribe, P.; Guezennec, J.; Dagaut, J.; Pepe, C.; Saliot, A. 1988. Identification of the Position and the Stereochemistry of the Double Bond in Monounsaturated Fatty Acid Methyl Esters by Gas Chromatography Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Derivates. *Anal. Chem.*, **60**: 928-931.
- Shakir, M.; Varkey, S. P. 1995. A new synthetic route for the preparation of a new series of 14-22 membered tetraoxamacrocyclic tetraamines and their transition metal complexes. *Polyedron*, **14**(9): 1117-1127.
- Silva, J. N. M. 2001. Manejo Florestal. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica.

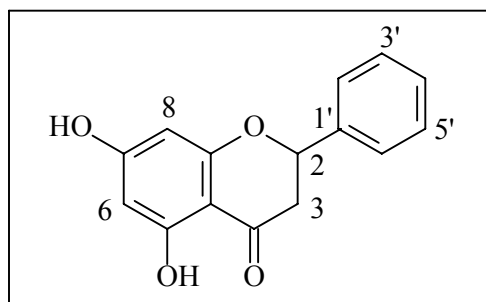
- Thies, W.; Kalko, E. K. V.; Hans, U. S. 1998. The roles of echolocation and olfaction in two Neotropical fruit-eating bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea*, feeding on *Piper*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **42**: 397-409.
- Thomas, D W.; Cloutier, D.; Provencher, M.; Houle, C. 1988. The shape of bird- and bat-generated seed shadows around a tropical fruiting tree. *Biotropica*, **20**(4): 347-348.
- Van den Dool and Kratz, P. D. J. 1964. A generalization of Retention Index System including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **11**: 463-471.
- Vieira, P. C. De Alvarenga, M. A.; Gottlieb, O. R.; Gottlieb, H. E. 1980. Título. *Planta Méd.* **39**: 153-156.
- Vila, R.; Milo, B.; Tomi, F.; Casanova, J.; Ferro, E. A.; Cañigüeral, S. 2001. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Piper fulvescens*, a plant traditionally used in Paraguay. *Journal of Ethnopharmacology*. **76** 105-107.
- Vogel, S. 1969. Chiropterophile in der neotropischen Flora. *Neue Mitteilungen III. Flora Abt. B* **158**: 289-323.
- Vyvyan, J. R.; Holst, C. L.; Johnson, A. J.; Schwenk, C. M. 2002. Total synthesis of gibbilibols A – D. *J. Org. Chem.* **67**: 2263-2265.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. 1971. Plant Antitumor Agents VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**(9): 2325-2327.
- Whitmore, T. C. 1997. Tropical Forest Disturbance, Disappearance, and Species Loss. Pp. 3012, In: Laurance, W. F.; Bierregaard, R. O.; Jr. (eds), *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities*. Chicago, University of Chicago Press.
- Whittaker, R. J.; Jones, S. H. 1994. The role of frugivorous bats and birds in the rebuilding of a tropical forest ecosystem, Krakatau, Indonesia. *Journal of Biogeography*, **21**: 245-258.

- Wilcove, D. S.; McLellan, C. H.; Dobson, A. P. 1986. Habitat fragmentation in the temperate zone. Pp 237-256, In: Soulé, M. J. (ed.), *Conservation biology*. Sunderland, Sinauer.
- Wilcox, B. A.; Murphy, D. D. 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *American Naturalist*, **125**: 879-887.
- Woerdenberg, H. J.; Lugt, C. B.; Prass, N. 1990. Artemisia annua L.: A Source of Novel Antimalarial Drugs. *Pharm. Weekbl.Sci. Ed.*, **12**(5): 169-181.
- Zaú, A. S. 1998. Fragmentação da Mata Atlântica: aspectos teóricos. *Floresta e Ambiente*, **5**(1): 160-170.

ANEXOS **A**

Tabela 10. Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 1 : 5,7-diidroxiflavanona ou pinocembrina.

Substância 1

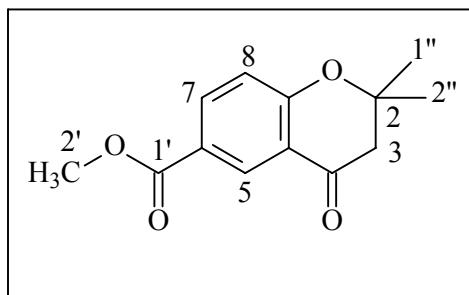


Carbono	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
2	5,4 (1H; dd; J = 12,8 Hz e J = 3,0 Hz)	79,3
3ax	3,0 (1H; dd; J = 12,8 Hz e J = 17,3 Hz)	43,4
3eq	2,8 (1H; dd; J = 3,0 Hz e J = 17,3 Hz)	43,4
4	-	196,1
5	-	164,2 #
6	6,0 (1H; dd; J = 3,0 Hz)	96,8 *
7	-	167,2 #
8	6,0 (1H; dd; J = 3,0 Hz)	95,9 *
9	-	163,4 #
10	-	102,7
1'	-	138,8
2' 6'	7,4 (2H; m)	126,4
3'	7,4 (3H; m)	129,1
4' 5'		

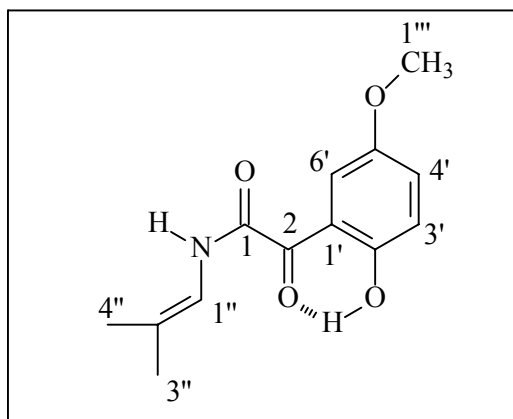
#, * valores intercambiáveis

Tabela 11. Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância **2**, o metil éster de 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona.

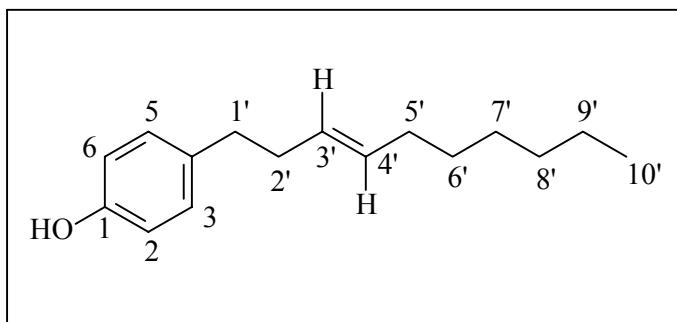
Substância 2



Carbono	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
2	-	80,3
3	2,7 (2H; s)	48,7
4	-	191,9
5	8,5 (1H; d; 2,0 Hz)	129,2
6	-	119,8
7	8,1 (1H; dd; J = 8,1 Hz e J = 2,0 Hz)	137,1
8	6,9 (1H; d; J = 8,1 Hz)	118,8
9	-	163,4
10	-	123,1
1'	-	166,4
2'	3,9 (3H; s)	52,2
1'' e 2''	1,48 (6H,s)	26,6

Tabela 12. Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 3**Substância 3**

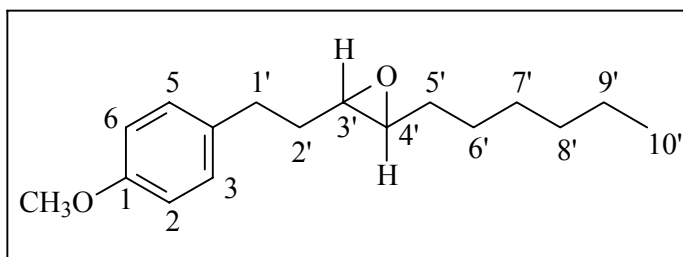
Carbono	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
1	-	167,3
2	-	196,0
1'	-	120,8
2'	8,5 (1H; d; 2,1 Hz)	132,5
3'	-	166,5
4'	8,1 (1H; dd; J = 8,4 Hz e J = 2,1 Hz)	136,7
5'	7,0 (1H; d; J = 8,4 Hz)	118,8
6'	-	160,3
1''	6,8 (1H; t; 1,4 Hz)	119,5
2''	-	120,2
3''	2,2 (3H; d; J = 1,4 Hz)	21,7
4''	2,0 (3H; d; J = 1,4 Hz)	28,5
1'''	3,9 (3H; s)	52,2

Tabela 13. Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 4.**Substância 4**

Carbono	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
1	-	153,7
2	6,7 (2H; d; J = 8,5 Hz)	115,2
3	7,0 (2H; d; J = 8,5 Hz)	129,7
4	-	134,7
5	7,0 (2H; d; J = 8,5 Hz)	129,7
6	6,7 (2H; d; J = 8,5 Hz)	115,2
1'	2,5 (2H; m)	35,3
2'	2,2 (2H; m)	34,7
3'	5,4 (1H; m)	131,4
4'	5,4 (1H; m)	129,5
5'	1,9 (2H; m)	32,6
6' 7' 8' 9'	1,2 (8H; m)	31,8 ; 29,7 ; 28,8 ; 22,6
10'	0,8 (3H; t)	14,1

Tabela 14. Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C do epóxido da substância 5.

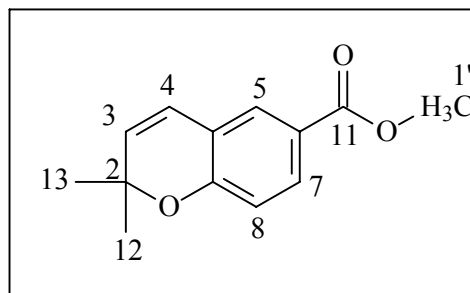
Substância 5 - epóxido



Carbono	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
1	-	133,4
2	7,1 (2H; d; J = 9,0 Hz)	129,6
3	6,8 (2H; d; J = 8,7 Hz)	113,4
4	-	157,7
5	6,8 (2H; d; J = 8,7 Hz)	113,4
6	7,1 (2H; d; J = 9,0 Hz)	129,6
1'	2,7 (2H; m)	31,4
2'	1,8 (2H; m)	34,1
3'	2,7 (1H; m)	59,2
4'	2,7 (1H; m)	58,2
5' 6' 7' 8' 9'	1,27/1,42/1,48 (10H; m)	32,1; 31,8; 29,7; 26,0; 22,6
10'	0,9 (3H; t)	14,0
H ₃ C-O	3,7 (3H; s)	55,2

Tabela 15. Valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e de ^{13}C da substância 6.

Substância 6



Carbono	RMN ^1H (ppm)	RMN ^{13}C (ppm)
2	-	77,0
3	5,6 (1H; d; J = 9,9 Hz)	121,6
4	6,3 (1H; d; J = 9,9 Hz)	128,0
5	7,6 (1H; d; J = 2,1 Hz)	131,06
6	-	122,0
7	7,8 (1H; dd; J = 8,4Hz e J = 2,1 Hz)	131,00
8	6,7 (1H; d; J = 8,4 Hz)	116,1
9	-	157,1
10	-	120,6
11	-	166,8
OCH ₃	3,8 (3H; s)	51,8
2 CH ₃	1,25 (6H; s)	28,3

Tabela 16: Componentes do óleo essencial dos frutos de *Piper gaudichaudianum*

- Aeração -

		FI _m	FI _t	FI _n	FM _m	FM _t	FM _n
COMPOSTO	IRL	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)
Monoterpenos hidrocarbonetos		20,87%	51,49%	34,31%	24,20%	27,96%	8,11%
01 Triciclono	926	933 (4,66)	933 (16,96)		933 (3,83)		
02 α -Pineno	939			933 (8,81)		938 (4,34)	938 (1,42)
03 Canfeno	953		950 (0,21)				
04 Sabineno	976	980 (9,11)	981 (21,07)	981 (16,24)	979 (11,06)	985 (12,75)	985 (3,83)
05 β -Pineno	980	988 (1,71)	988 (3,66)		988 (2,06)		
06 Mirceno	991					995 (2,33)	995 (0,66)
07 δ -2-Careno	1001				1010 (0,98)		
08 α -Felandreno	1005	1008 (0,23)				1012 (0,59)	1013 (0,21)
09 Isosilvestreno	1007						1015 (0,70)
10 δ -3-Careno	1011		1010 (5,58)				
11 o-Cimeno	1022	1024 (1,54)	1024 (0,25)				
12 p-Cimeno	1026			1025 (3,56)		1029 (0,59)	1029 (0,43)
13 Limoneno	1031	1028 (1,00)	1028 (1,30)	1029 (1,68)	1028 (1,88)	1033 (2,41)	1033 (0,57)
14 β -Felandreno	1031			1030 (0,74)			
15 (Z)- β -Ocimeno	1040	1032 (0,98)	1032 (0,67)	1032 (1,17)	1032 (1,08)	1037 (1,43)	
16 (E)- β -Ocimeno	1050	1042 (1,64)	1042 (1,79)	1043 (2,11)	1042 (3,31)	1047 (3,52)	1047 (0,29)
Monoterpenos oxigenados		0,19%	-	2,73%	8,69%	1,70%	0,16%
17 Fenchona	1087			1096 (2,60)			
18 <i>trans</i> -Hidrato do sabineno	1097				1095 (8,69)	1101 (1,70)	1101 (0,16)
19 <i>cis</i> -Óxido de rosa	1111	1108 (0,19)		1108 (0,13)			
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		52,86%	41,58%	52,28%	11,95%	38,72%	5,95%
20 δ -Elemeno	1339	1334 (0,48)	1333 (0,20)	1334 (0,41)		1339 (0,47)	
21 α -Cubebeno	1351	1349 (0,10)	1348 (0,11)	1349 (0,26)			
22 Ciclosativeno	1368	1371 (0,30)	1371 (0,180)				
23 Isoledeno	1373	1374 (0,21)	1373 (0,21)	1371 (0,50)			
24 Longiciclono	1373			1374 (0,16)			
25 α -Copaeno	1376	1378 (3,82)	1378 (4,03)	1378 (3,93)		1383 (2,36)	1383 (0,43)
26 β - Patchouleno	1380				1377 (1,17)		

27 β -Cubebeno	1390	1380 (0,71)					
28 β -Elemeno	1391	1391 (0,38)		1391 (0,22)		1396 (0,50)	
29 α -Gurjuneno	1409	1409 (0,26)	1409 (0,25)	1410 (0,67)			
30 α -Cedreno	1409		1416 (0,30)	1417 (0,36)			
31 <i>cis</i> - α -Bergamoteno	1415	1416 (0,30)					
32 β -Cariofileno	1418	1424 (31,11)	1425 (20,87)	1426 (21,44)	1422 (3,44)	1428 (12,04)	
33 β -Gurjuneno	1432	1433 (1,38)	1433 (0,27)	1434 (1,73)	1432 (0,63)	1438 (0,78)	
34 α - <i>trans</i> -Bergamoteno	1436			1435 (0,18)		1441 (0,37)	
35 Aromadendreno	1439	1442 (1,15)	1442 (0,65)	1442 (0,99)		1447 (0,85)	1428 (2,97)
36 α -Guaiano	1439	1438 (1,39)	1438 (1,68)	1438 (1,04)		1444 (0,38)	
37 α -Humuleno	1454		1459 (2,85)	1461 (8,56)	1459 (2,06)	1465 (12,62)	1465 (1,70)
38 <i>cis</i> -Muurolo-4(14)5-dieno	1460		1464 (1,95)	1465 (2,67)			
39 <i>allo</i> -Aromadendreno	1461					1470 (1,09)	
40 β -Chamigreno	1475					1485 (1,24)	
41 γ -Himachaleno	1476	1464 (3,12)					
42 γ -Muurolo	1477	1476 (1,97)	1476 (1,35)	1477 (1,48)	1478 (0,71)		
43 D-Germacreno	1480	1479 (0,36)	1478 (0,30)	1479 (0,75)	1484 (0,44)	1491 (0,72)	
44 <i>cis</i> - β -Guaiano	1490	1485 (0,25)		1485 (1,21)			
45 Valenceno	1491	1496 (0,65)	1483 (0,68)	1496 (0,54)			
46 α -Selineno	1494		1493 (0,64)		1502 (1,62)	1499 (1,05)	
47 Biciclogermacreno	1494	1500 (2,01)	1500 (1,10)	1501 (1,97)			
48 <i>trans</i> - β -Guaiano	1500					1502 (0,76)	
49 α -Bulneseno	1505	1506 (2,28)	1506 (2,77)	1507 (1,79)		1512 (0,90)	1512 (0,23)
50 γ -Cadineno	1513	1518 (0,32)	1517 (0,24)	1518 (0,49)	1517 (0,65)	1523 (1,22)	1523 (0,19)
51 7- <i>epi</i> - α -Selineno	1517	1524 (0,31)					
52 δ -Cadineno	1524		1522 (0,60)	1523 (0,93)	1522 (1,23)	1528 (1,37)	1528 (0,43)
53 <i>trans</i> -Calameneno	1532		1526 (0,35)				
Sesquiterpenos oxigenados		-	-	0,10%	0,47%	-	0,78%
54 Propanoato de geranila	1475						1471 (0,48)
55 (<i>E</i>) Nerolidol	1564				1563 (0,47)		1570 (0,30)
56 Óxido himachaleno	1574			1581 (0,10)			
Outros		5,02%	3,16%	3,13%	20,83%	2,76%	70,99%
57 Naftaleno	1179	1190 (0,56)	1189 (0,18)				
58 n-Dodecano	1199				1199 (0,54)	1204 (0,34)	
59 n-Tridecano	1299	1301 (1,07)	1301 (1,54)	1301 (0,96)		1306 (0,41)	
60 n-Tetradecano	1399	1400 (0,24)		1401 (0,11)	1399 (0,85)	1405 (0,68)	1405 (0,29)
61 n-Pentadecano	1500	1502 (3,15)	1502 (1,44)	1503 (2,06)			1508 (1,12)
62 n-Hexadecano	1600				1599 (0,57)	1606 (0,46)	1606 (0,26)
63 n-Heptadecano	1700					1708 (0,34)	1708 (0,18)
64 1-Octadeceno	1793				1793 (0,56)		
65 n-Octadecano	1800				1799 (0,65)		

66 n-Eicosano	2000				2007 (0,30)	2007 (0,22)
67 Éster bis(2-etilexil) do				17,66%	0,23%	68,92%
ácido hexanodióico						
Total identificados		78,94%	96,23%	92,55%	66,14%	71,14%
					85,99%	

FI_m – Frutos Imaturos manhã

FI_t – Frutos Imaturos tarde

FI_n – Frutos Imaturos noite

FM_m – Frutos Maduros manhã

FM_t – Frutos Maduros tarde

FM_n – Frutos Maduros noite

IRL – Índice de Retenção – Literatura

IRC (%) – Índice de Retenção Calculado (percentual detectado)

Tabela 17: Componentes do óleo essencial dos frutos de *Piper gaudichaudianum*

- Hidrodestilação -

		FI _m	FI _t	FI _n	FM _m	FM _t	FM _n
COMPOSTO	IRL	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)	IRC (%)
Monoterpenos		-	0,51%	0,79%	0,89%	5,19%	2,29%
hidrocarbonetos							
01 Triciclono	926					927 (1,09)	927 (0,29)
02 Sabineno	976		979 (0,20)	979 (0,79)	979 (0,27)		979 (2,00)
03 β-Pineno	980					981 (2,82)	
04 Mirceno	991					989 (0,10)	
05 δ-3-Careno	1011					1012 (0,12)	
06 p-Cimeno	1026					1026 (0,17)	
07 Limoneno	1031				1030 (0,62)	1030 (0,53)	
08 (Z)-β-Ocimeno	1040					1034 (0,14)	
09 (E)-β-Ocimeno	1050		1044 (0,31)			1044 (0,22)	
Monoterpenos oxigenados		-	14,85%	17,51%	-	-	8,38%
10 Fenchona	1087		1098 (14,68)	1098 (17,26)			
11 Linalool	1098						1098 (8,38)
12 Acetato de bornila	1285		1288 (0,17)	1288 (0,250)			
Sesquiterpenos		39,41%	18,10%	30,22%	22,07%	42,42%	26,05%
hidrocarbonetos							
13 α-Cubebeno	1351	1349 (0,12)	1349 (0,20)	1349 (0,28).			
14 Isoledeno	1373	1371 (0,13)	1371 (0,16)			1372 (0,16)	
15 Longiciclono	1373	1374 (0,12)				1375 (0,15)	
16 α-Copaeno	1376	1378 (1,38)	1378 (1,24)	1378 (1,77)	1378 (1,90)		1378 (1,31)
17 β-Patchoulono	1380					1379 (1,98)	
18 α-Gurjuneno	1409		1409 (0,30)	1409 (0,55)		1410 (0,11)	1410 (0,59)
19 cis-α-Bergamoteno	1415	1415 (0,13)				1418 (0,17)	
20 β-Cariofileno	1418	1423 (15,43)		1423 (8,21)	1423 (10,76)	1428 (15,74)	1423 (7,41)
21 β-Gurjuneno	1432	1433 (0,50)	1433 (0,54)	1433 (0,68)	1433 (0,25)	1434 (0,52)	1434 (0,37)
22 Aromadendreno	1439		1442 (0,44)	1442 (0,57)	1442 (0,35)	1443 (0,90)	1442 (0,90)
23 α-Guaieno	1439	1438 (0,54)				1439 (0,80)	
24 α-Humuleno	1454	1460 (10,45)	1460 (3,54)	1460 (6,55)	1460 (2,79)	1464 (10,67)	1460 (10,80)
25 allo-Aromadendreno	1461	1464 (1,72)		1464 (0,88)	1464 (1,28)		1465 (0,31)

26 γ -Gurjuneno	1473					1467 (1,55)	
27 γ -Himachaleno	1476	1477 (0,84)				1478 (0,93)	
28 γ -Muuroleno	1477	1479 (0,57)	1479 (1,83)	1479 (2,15)	1479 (0,61)	1480 (0,64)	1480 (0,78)
29 D-Germacreno	1480			1485 (0,84)			
30 β -Selineno	1485	1494 (0,96)		1494 (0,84)			
31 <i>cis</i> - β -Guaiano	1490		1485 (0,85)	1497 (0,65)		1485 (0,35)	
32 Valenceno	1491	1496 (0,51)	1501 (1,40)			1497 (0,55)	
33 Viridifloreno	1493						1495 (0,58)
34 α -Selineno	1494	1501 (1,92)	1494 (0,66)	1501 (1,24)	1494 (0,22)	1502 (1,16)	
35 α -Muuroleno	1499	1503 (0,72)	1503 (0,82)	1503 (0,87)	1504 (1,17)	1505 (0,74)	1504 (0,66)
36 α -Bulneseno	1505					1508 (1,77)	
37 γ -Cadineno	1513	1518 (0,55)	1518 (1,20)	1518 (1,00)	1518 (0,43)	1519 (0,57)	1519 (0,77)
38 δ -Cadineno	1524	1523 (1,20)	1523 (3,36)	1523 (2,40)	1523 (0,81)	1524 (2,02)	1523 (1,57)
39 <i>trans</i> -Calameneno	1532		1527 (0,67)	1527 (0,74)	1527 (0,58)	1528 (0,40)	
40 Cadina-1,4-diene	1532		1537 (0,26)				
41 <i>cis</i> - γ -Bisaboleno	1533	1524 (1,09)					
42 α -Cadineno	1538		1541 (0,38)			1542 (0,11)	
43 α -Calacoreno	1542	1546 (0,26)	1546 (0,25)		1547 (0,36)	1547 (0,28)	
44 Selina-3,7(11)-dieno	1542	1541 (0,13)					
45 b-Calacoreno	1563				1568 (0,28)		
46 Cadaleno	1674	1681 (0,14)			1682 (0,28)	1682 (0,15)	
Sesquiterpenos oxigenados		12,55%	37,95%	35,19%	7,22%	5,59%	32,85%
47 2,6-di-ter-5-metil-fenol		1507 (4,91)	1507 (1,44)	1507 (1,55)	1507 (4,95)		1508 (0,86)
1512							
48 (<i>E</i>)-Nerolidol	1564	1564 (0,90)	1566 (13,91)	1565 (11,45)			1565 (23,30)
49 Longipinanol	1566					1561 (0,08)	
50 Germacreno-D-4-ol	1574					1567 (2,82)	
51 Espatuleno	1576	1582 (0,68)	1583 (2,94)	1583 (2,71)		1584 (0,25)	1583 (1,34)
52 Óxido de cariofileno	1581	1587 (1,88)	1587 (2,76)	1587 (5,01)	1587 (1,31)	1588 (1,13)	1587 (2,66)
53 Guaiol	1595		1591 (1,35)	1600 (1,82)		1601 (0,16)	
54 Epóxido humuleno II	1606	1615 (0,95)	1616 (4,66)	1616 (5,40)			1616 (4,06)
55 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1614		1620 (0,44)	1620 (0,22)		1621 (0,11)	
56 1- <i>epi</i> -Cubenol	1627		1633 (1,61)	1633 (1,01)	1634 (0,21)	1634 (0,31)	
57 γ -Eudesmol	1630					1639 (0,12)	
58 <i>epi</i> - α -Cadinol	1640	1648 (0,63)	1640 (1,21)	1649 (1,35)	1649 (0,37)	1650 (0,44)	1650 (0,63)
59 Cubenol	1642		1649 (2,28)				
60 α -Muurolol	1645	1653 (0,34)	1654 (1,49)	1654 (1,20)			
61 α -Cadinol	1653	1663 (2,26)	1663 (3,86)	1663 (2,17)	1652 (0,38)	1652 (0,25)	

62 β -Bisabolol	1671			1666 (1,30)		
Outros		0,18%	-	-	1,92%	0,15%
63 n-Tridecano	1299					1301 (0,15)
64 n-Tetradecano	1399	1400 (0,18)			1400 (0,17)	
65 n-Hexadecano	1600				1600 (0,25)	
66 1-Octadeceno	1793				1793 (0,56)	
67 n-Octadecano	1800				1799 (0,65)	
68 metil-Linoleato	2092				2097 (0,29)	
Total identificados		52,14%	71,41%	83,71%	32,10%	53,35%
					69,57%	

FI_m – Frutos Imaturos manhã

FI_t – Frutos Imaturos tarde

FI_n – Frutos Imaturos noite

FM_m – Frutos Maduros manhã

FM_t – Frutos Maduros tarde

FM_n – Frutos Maduros noite

IRL – Índice de Retenção – Literatura

IRC (%) – Índice de Retenção Calculado (percentual detectado)

ANEXOS B

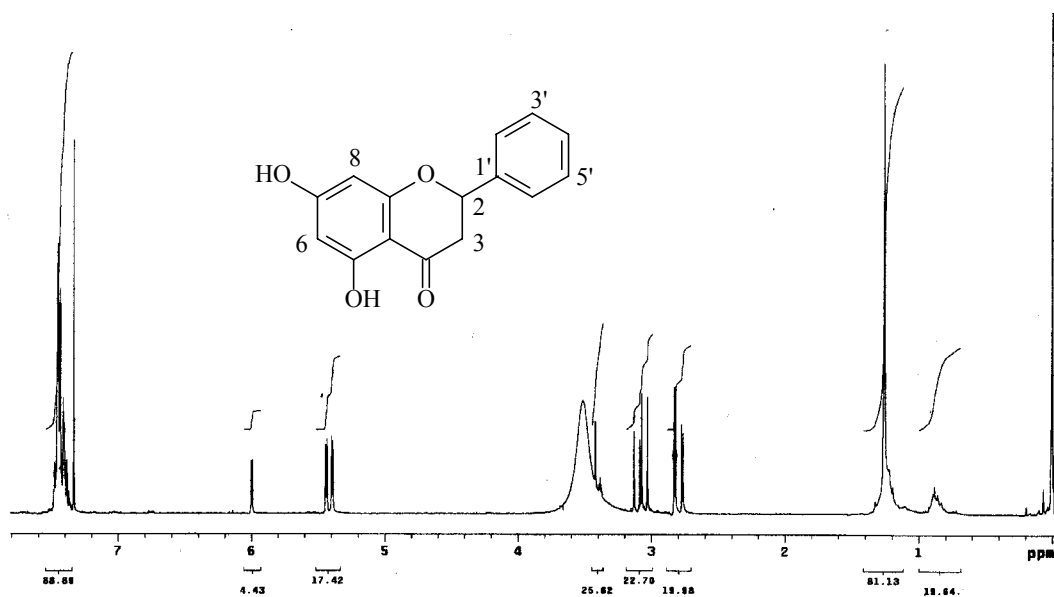


Figura 12. Espectro de RMN ^1H da substância (1) 5,7-diidroxi-flavanona

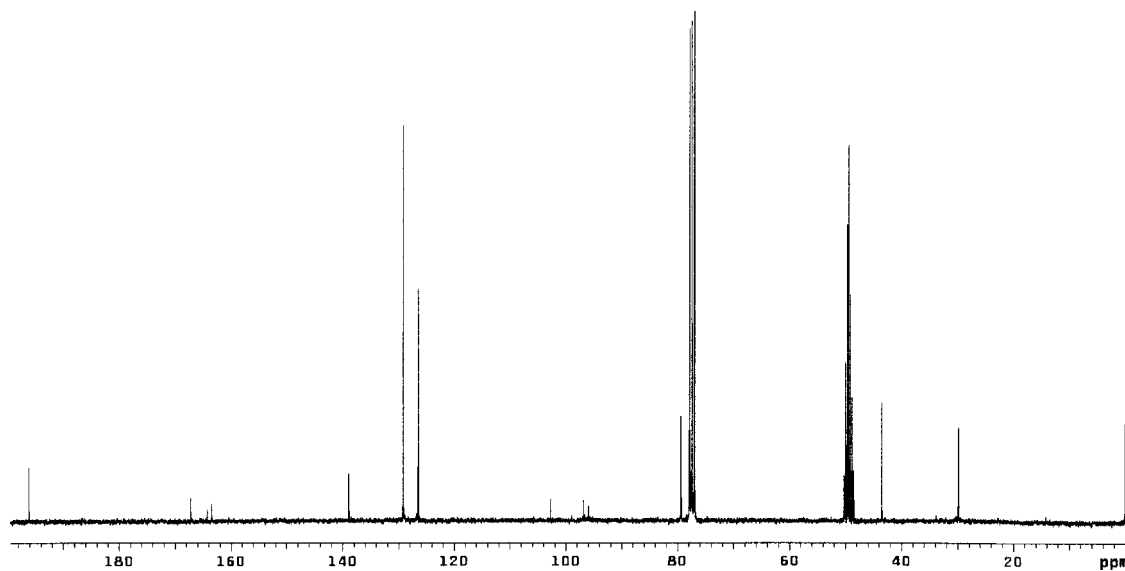


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C da substância (1) 5,7-diidroxi-flavanona

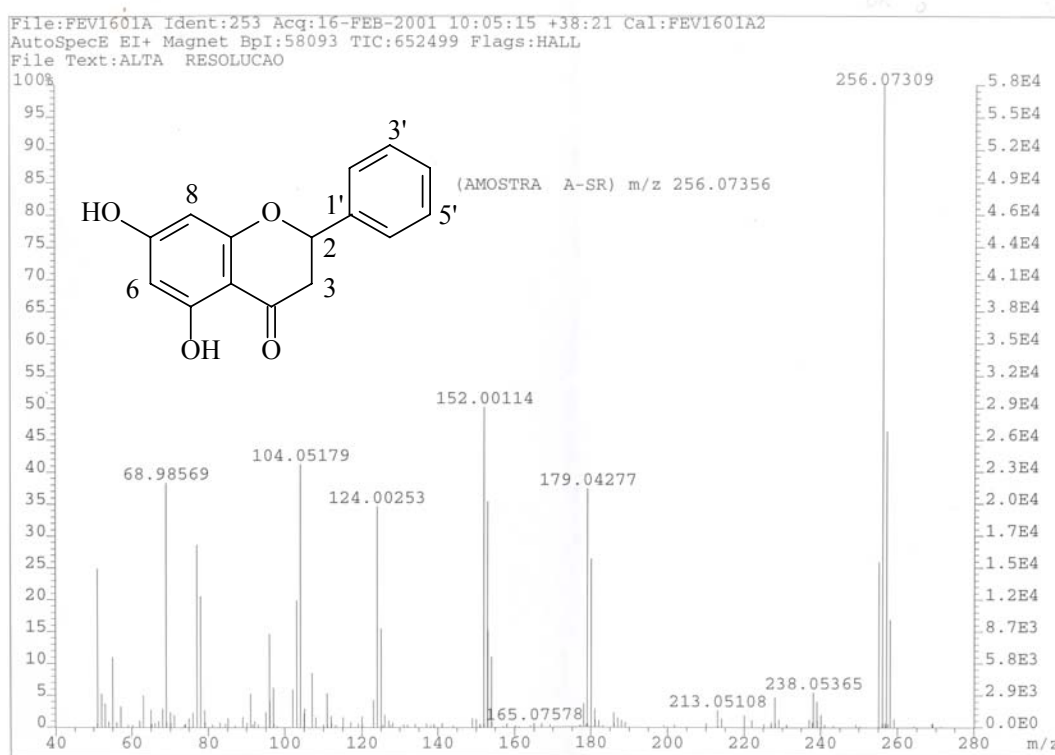


Figura 14. Espectro de Massas de alta resolução da substância (1) 5,7-diidroxi-flavanona

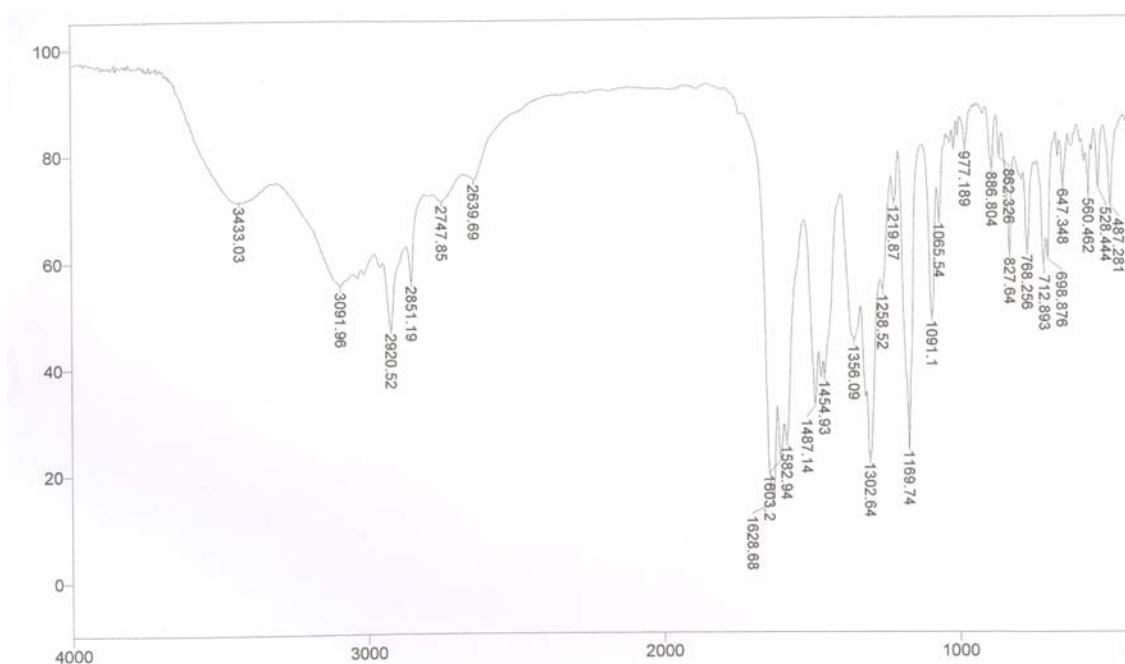


Figura 15. Espectro no infravermelho da substância (1) 5,7-diidroxi-flavanona

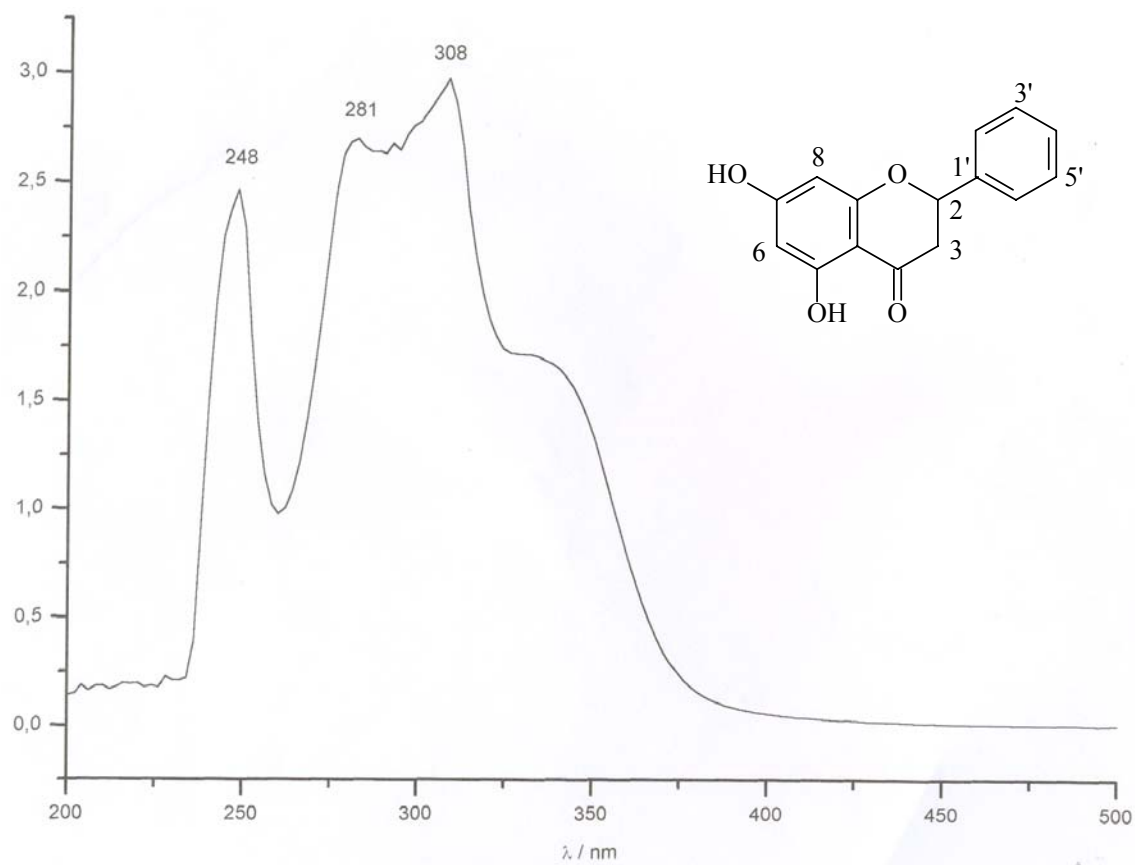


Figura 16. Espectro no ultravioleta (**1**) 5,7-diidroxi-flavanona

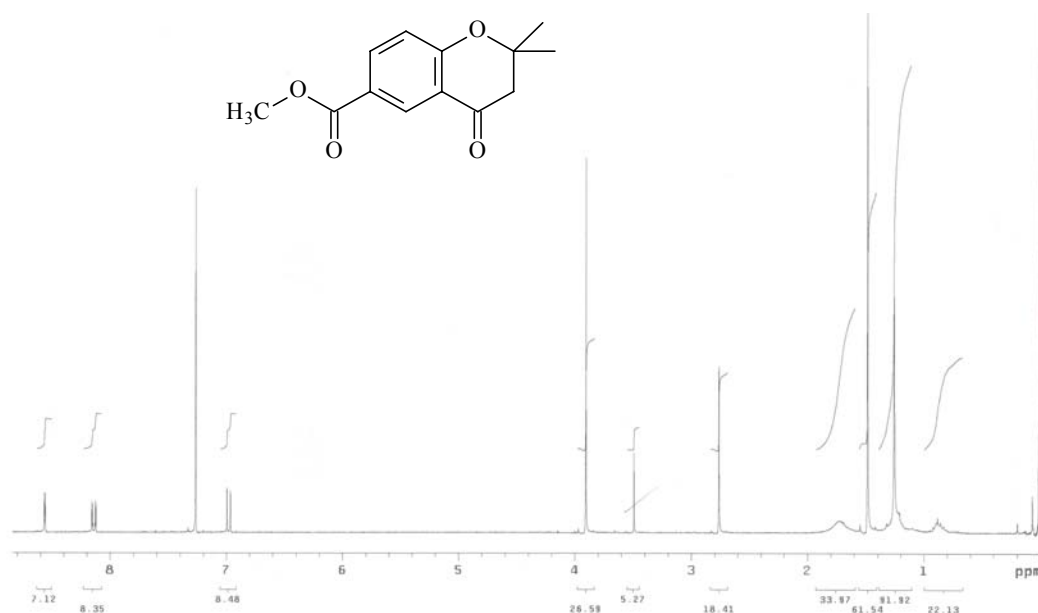


Figura 17. Espectro de RMN ^1H da substância (2) 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

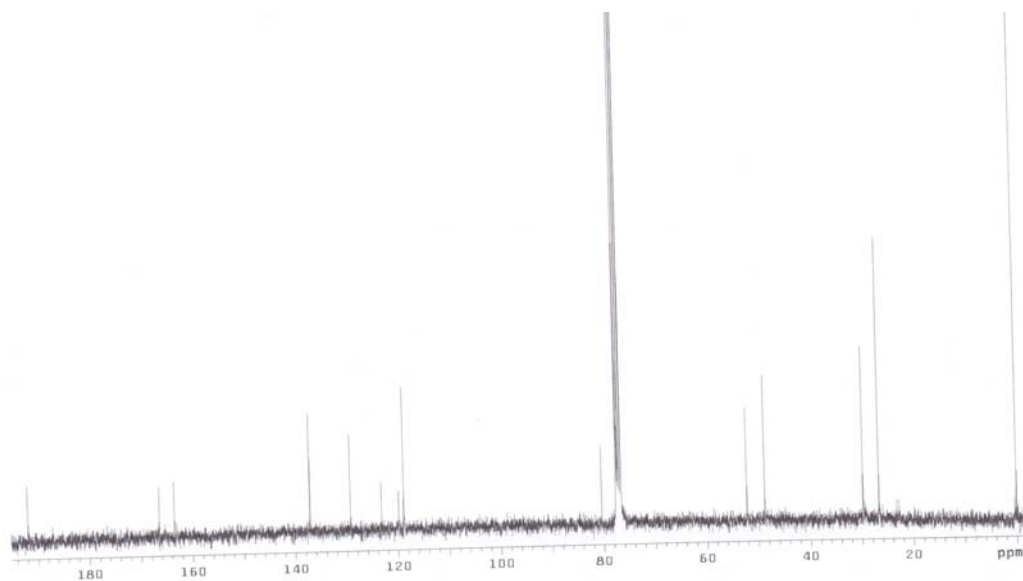


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C da substância (2) 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

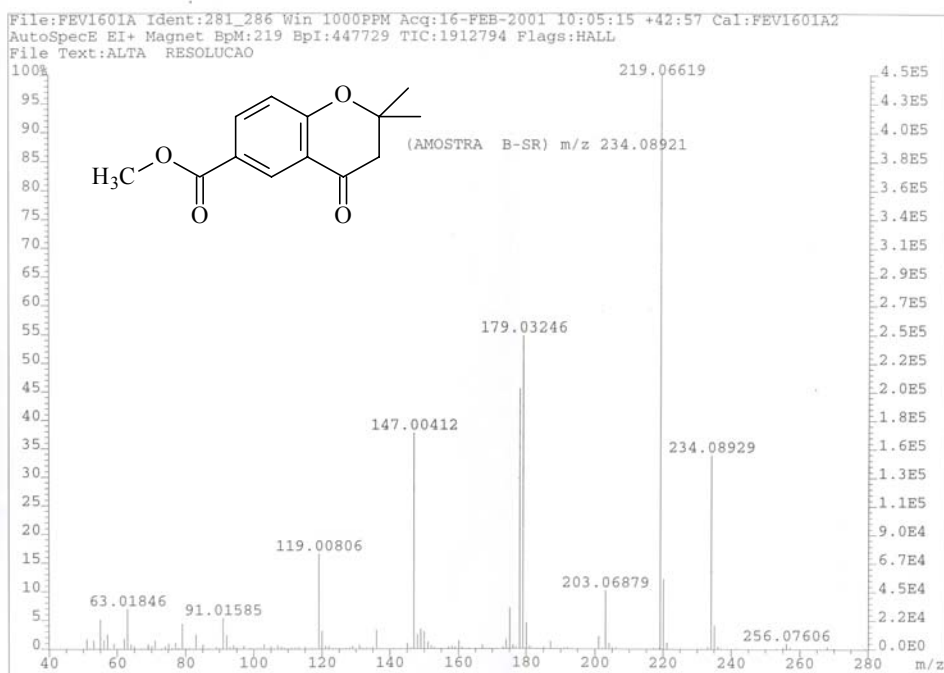


Figura 19. Espectro de Massas de alta resolução da substância **(2)** 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

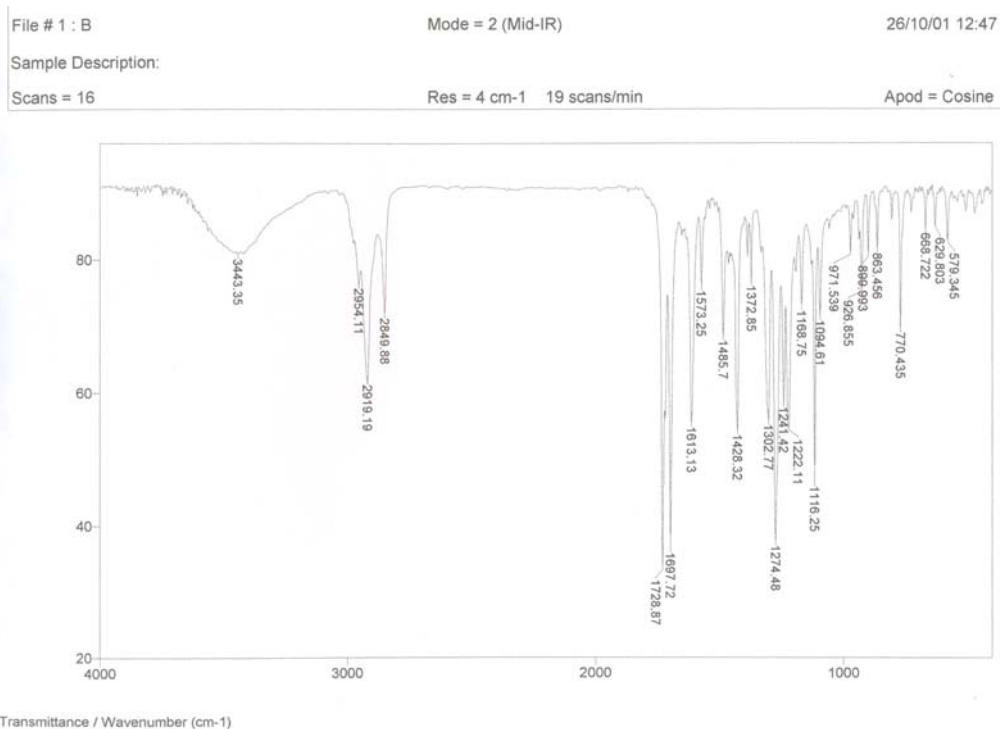


Figura 20. Espectro no infravermelho da substância **(2)** 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

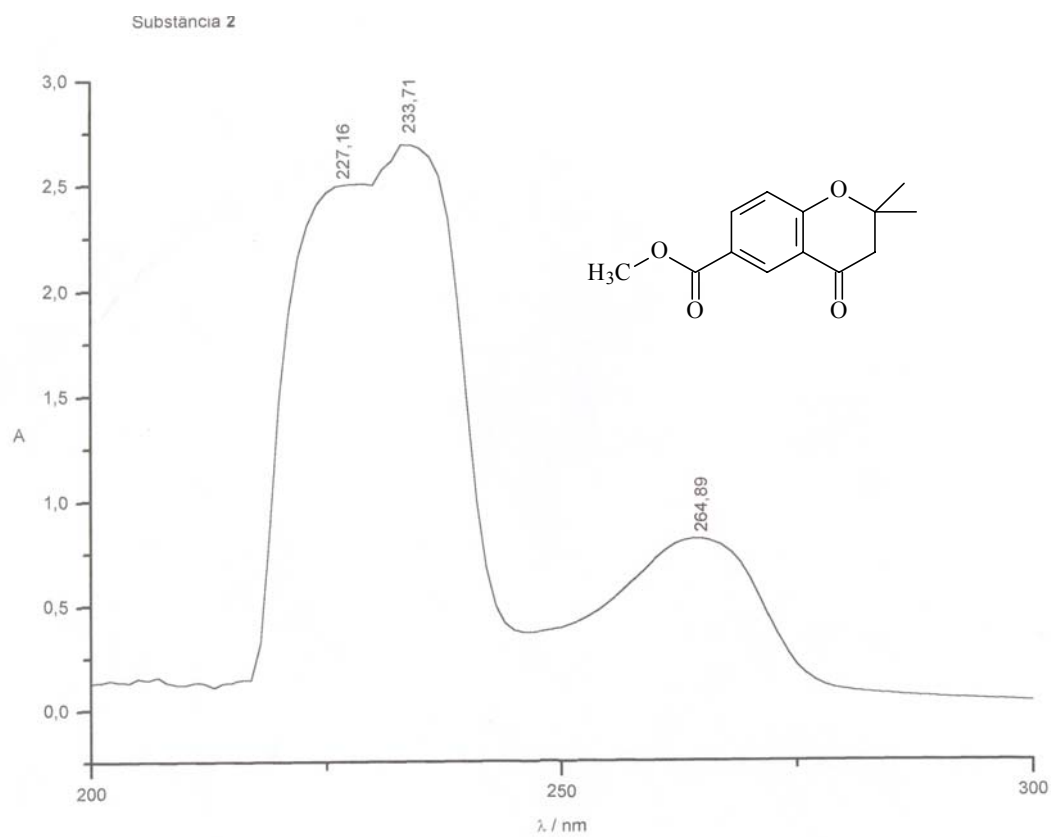


Figura 21. Espectro no ultravioleta da substância (2) 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

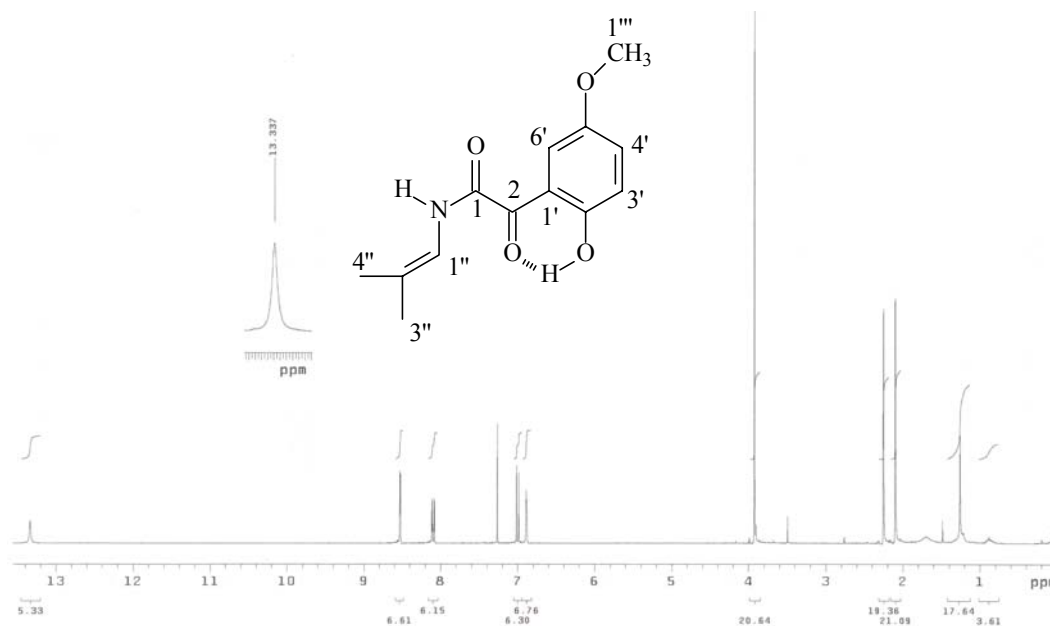


Figura 22. Espectro de RMN ^1H da substância **(3)** 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-oxo-acetamida

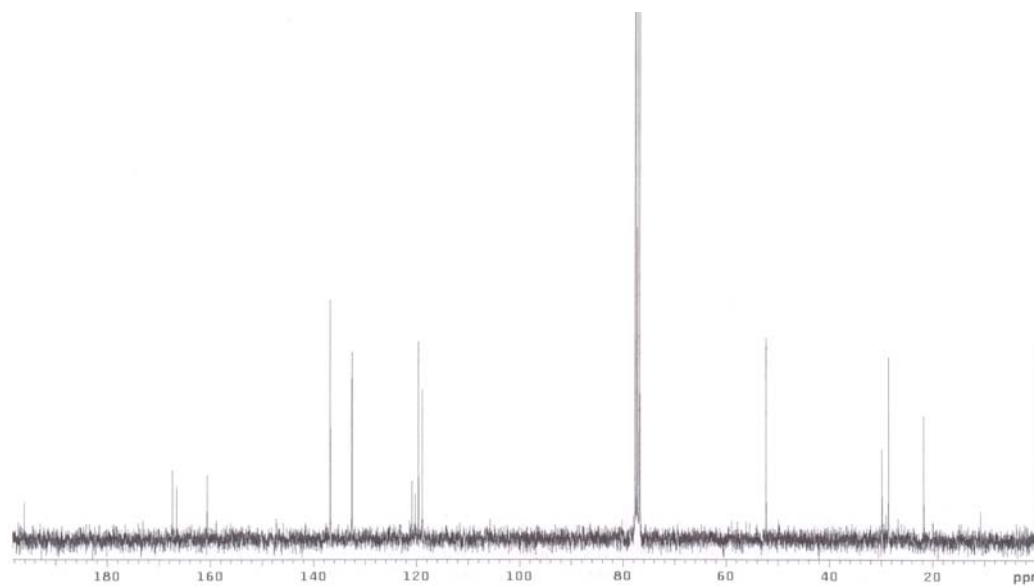


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C da substância **(3)** 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-oxo-acetamida

File # 1 : D Mode = 2 (Mid-IR) 26/10/01 13:30

Sample Description:

Scans = 16 Res = 4 cm-1 20 scans/min Apod = Cosine

Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Wavenumber (cm-1)
3441.38
3060.3
2915.92
2854.3
2857.17
1714.87
1640.94
1617.74
1581.9
1490.1
1434.83
1375.76
1310.78
1278.94
1234.66
1173.13
1112.65
1020.26
974.413
854.115
795.403
777.831
717.802
634.736

Figura 25. Espectro no infravermelho da substância (3) 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-oxo-acetamida

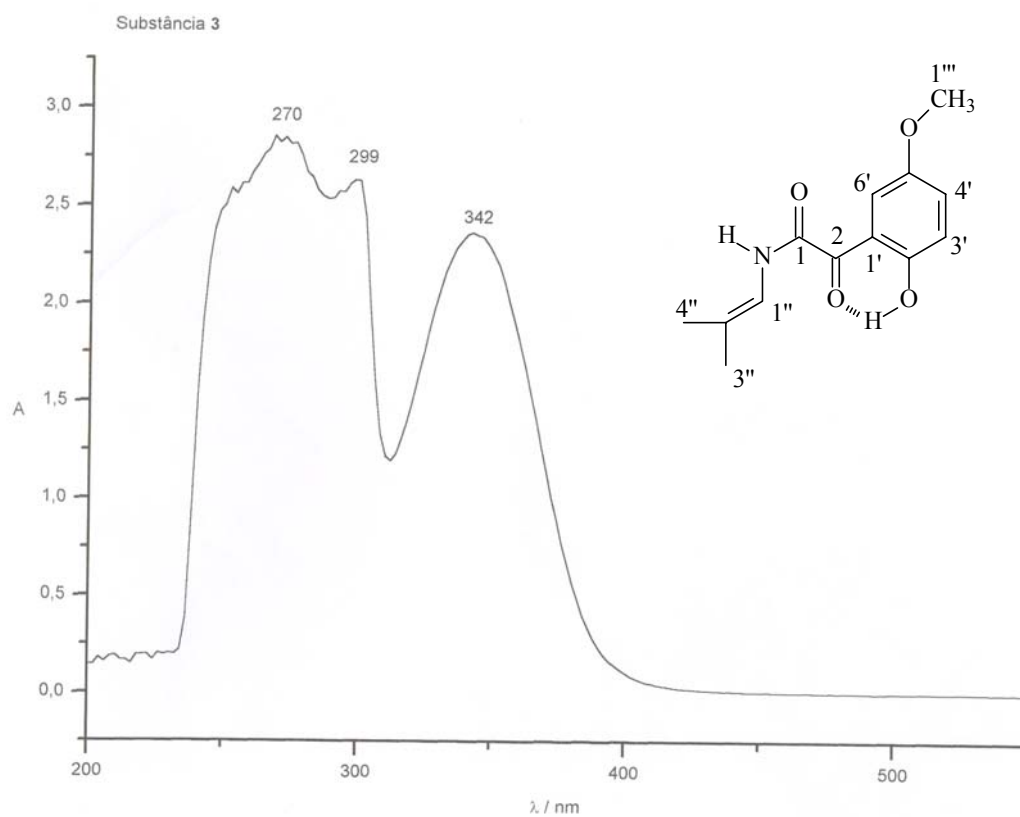


Figura 26. Espectro no ultravioleta da substância (3) 2-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-N-(2''-metilpropenil)-oxo-acetamida

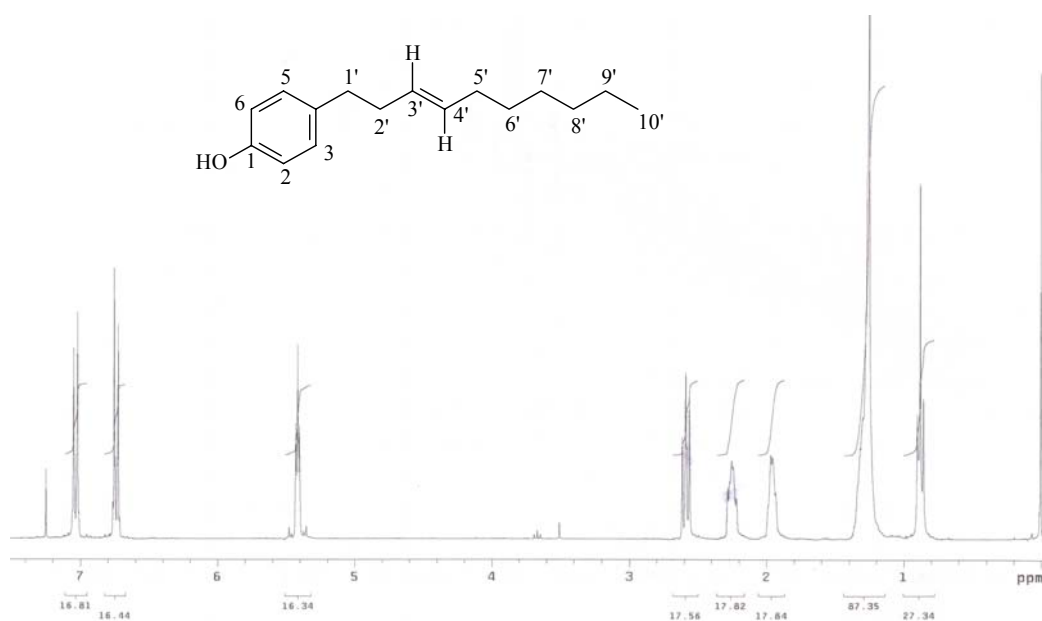


Figura 27. Espectro de RMN ^1H da substância (4) 4-(3'(E)-decenil)fenol

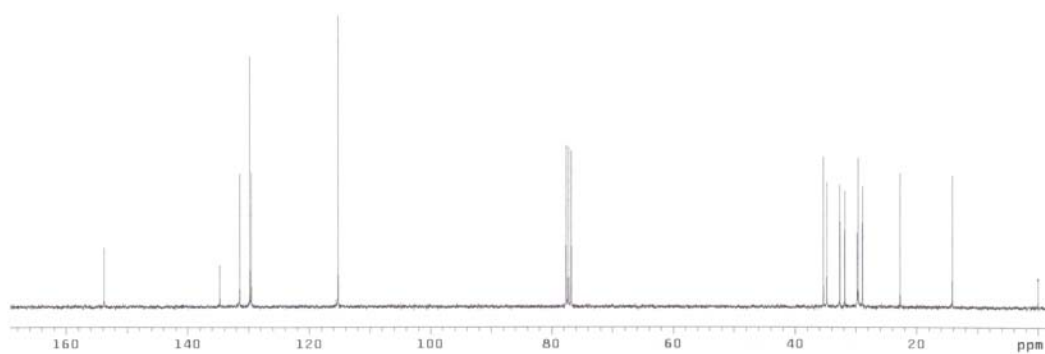


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C da substância (4) 4-(3'(E)-decenil)fenol

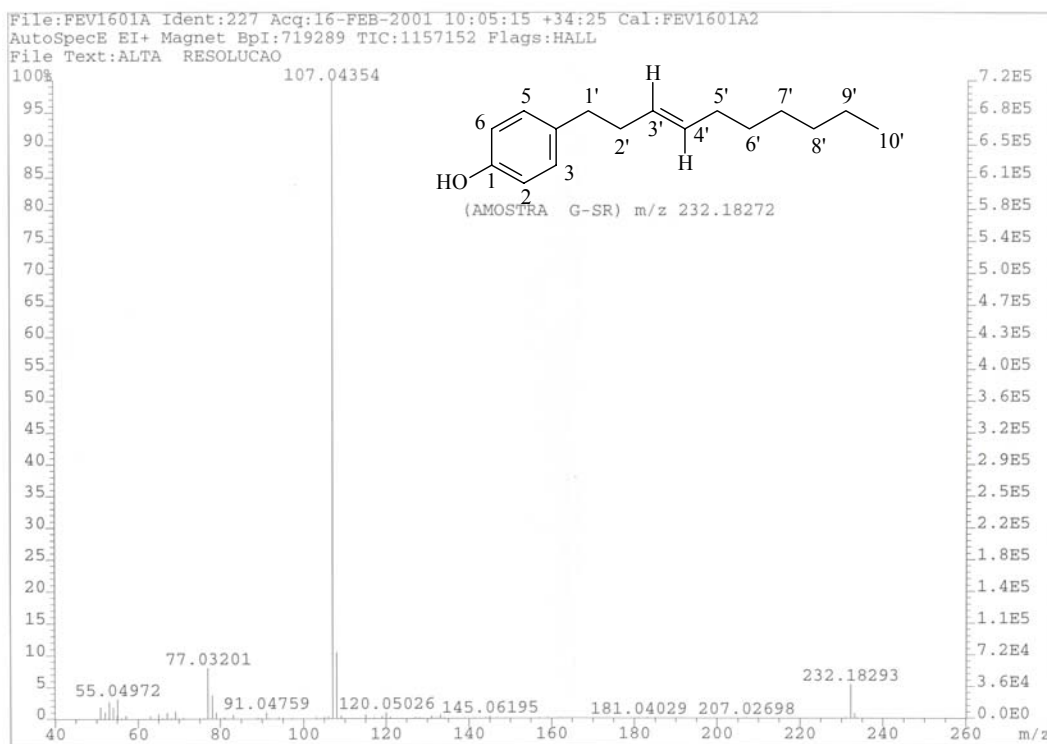


Figura 29. Espectro de Massas de alta resolução da substância (4) 4-(3'(E)-decenilfenol

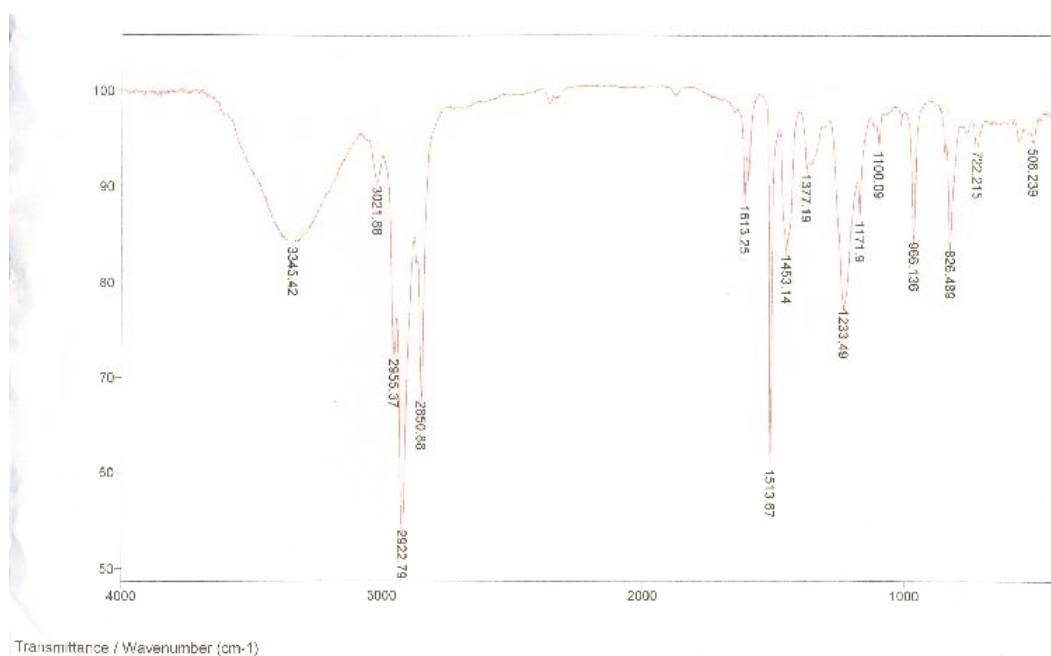


Figura 30. Espectro no infravermelho da substância (4) 4-(3'(E)-decenilfenol

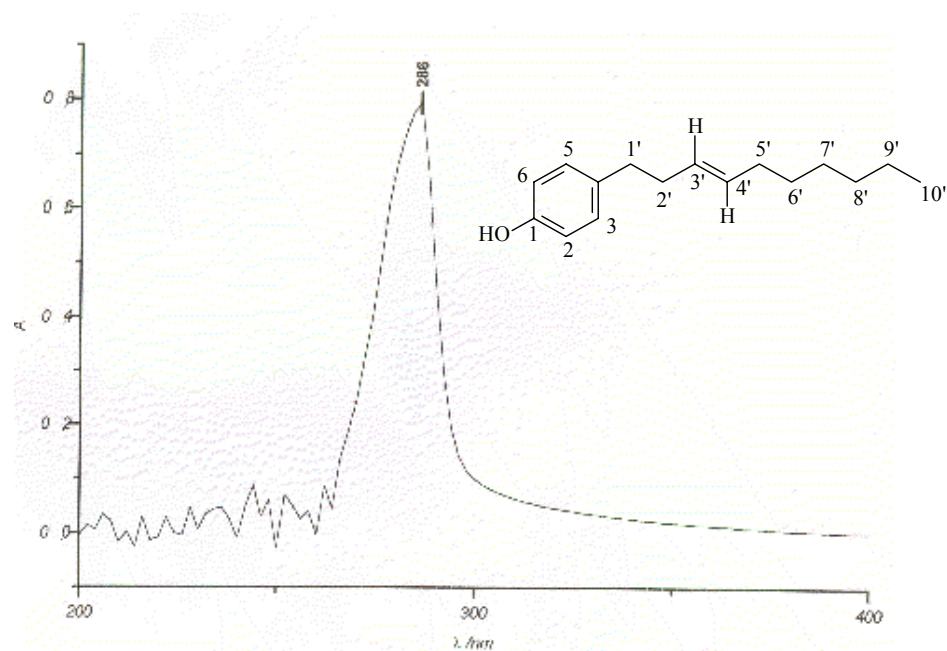


Figura 31. Espectro no ultravioleta da substância (4) 4-(3'(E)-decenilfenol

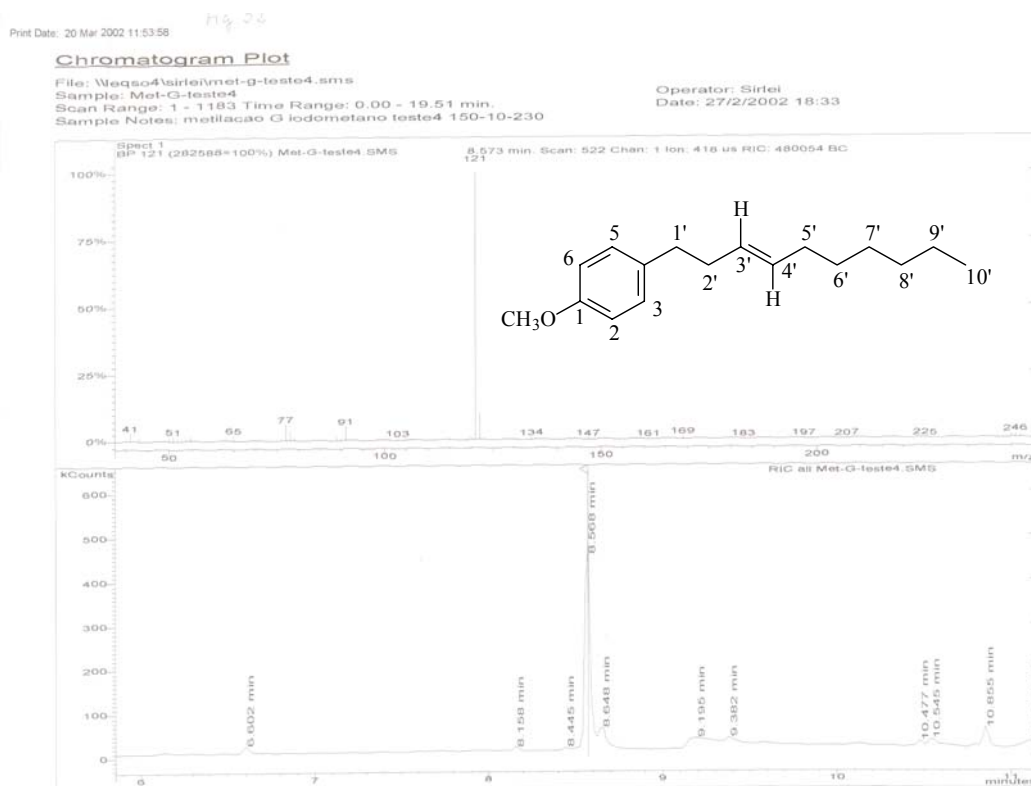


Figura 32. Cromatograma e Espectro de Massas da substância **(5)** (E)-4-(3'-decenil) metoxibenzeno

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\analises\tic\dmds.sms

Sample: dmds

Scan Range: 1 - 1810 Time Range: 0.00 - 29.98 min.

Operator: Tic

Date: 5/4/01 3:58 PM

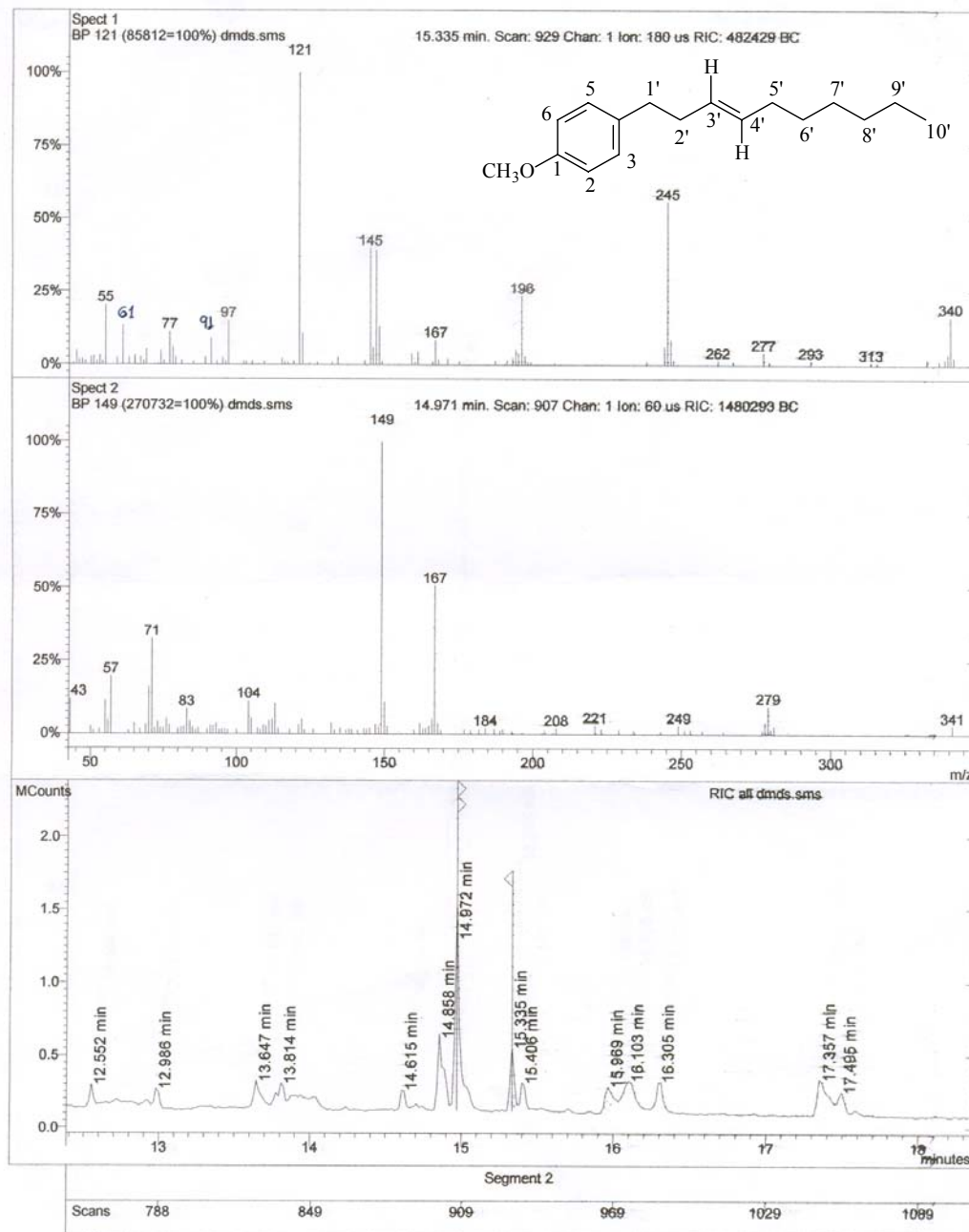


Figura 33. Cromatograma e Espectro de Massas da substância (5) (E)-4-(3'-decenil) metoxibenzeno após reação com DMDS

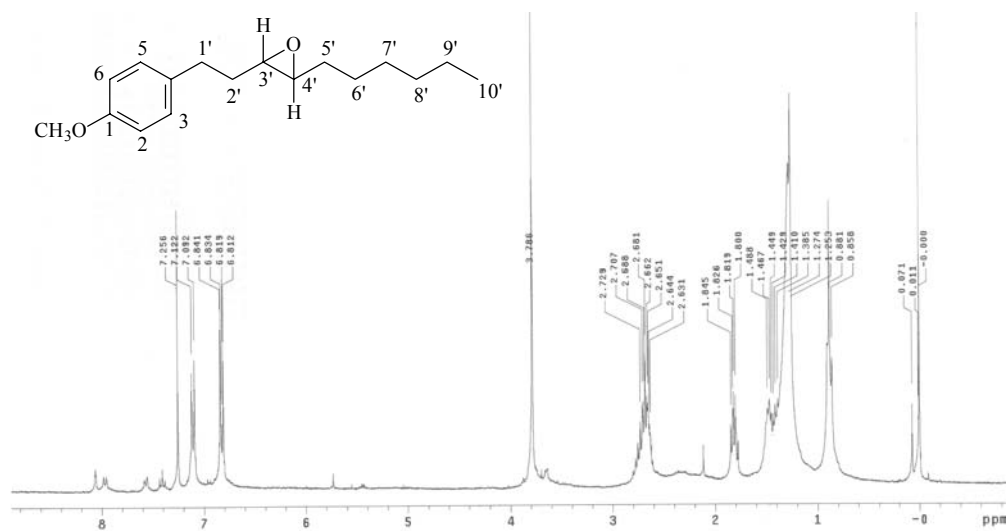


Figura **34**. Espectro de RMN ^1H da substância **(5 – epóxido) (E)-4-(3'-4'-epoxidecano) metoxybenzene**

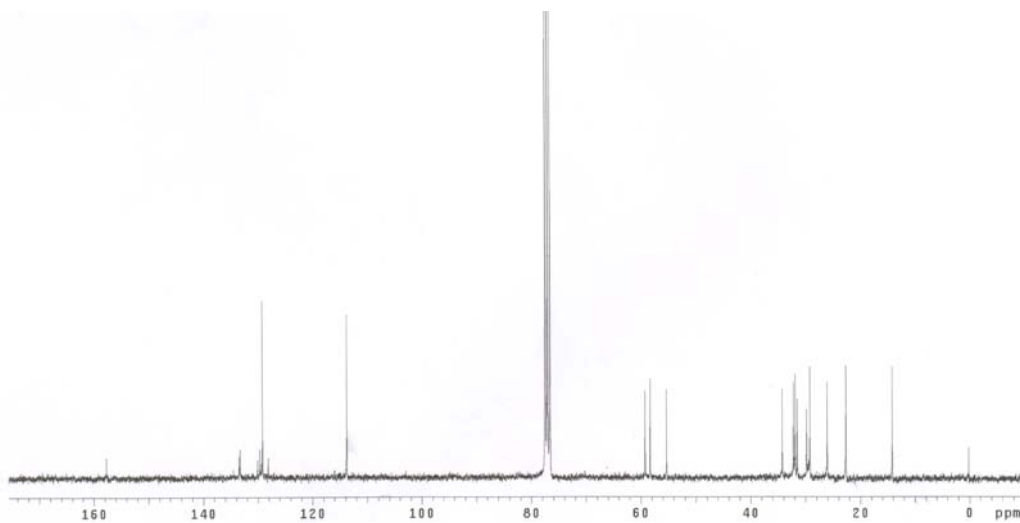


Figura **35**. Espectro de RMN ^{13}C da substância **(5 – epóxido) (E)-4-(3'-4'-epoxidecano) metoxybenzene**

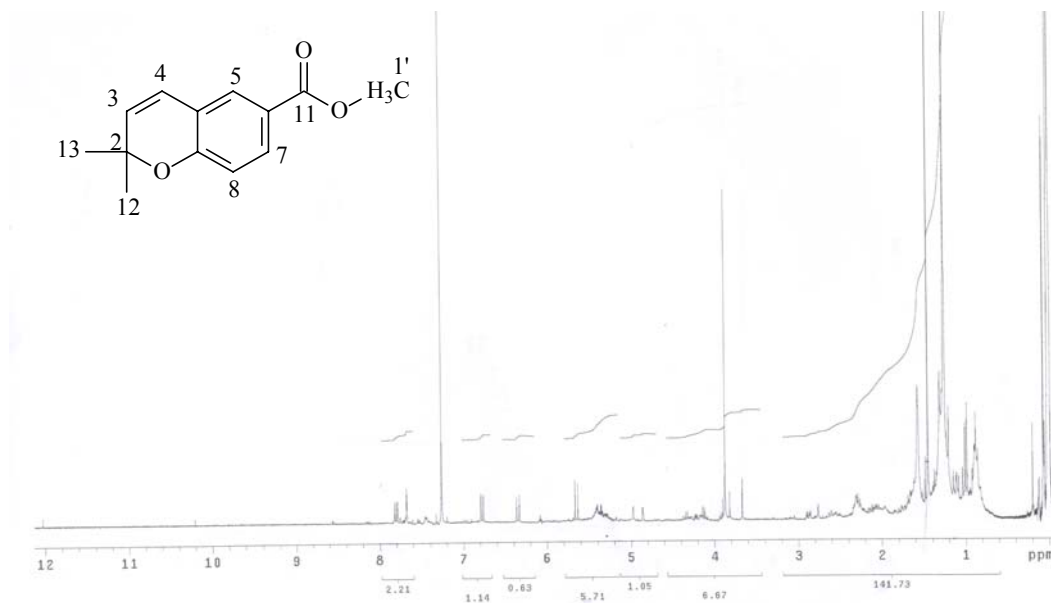


Figura 36. Espectro de RMN ^1H da substância **(6)** 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

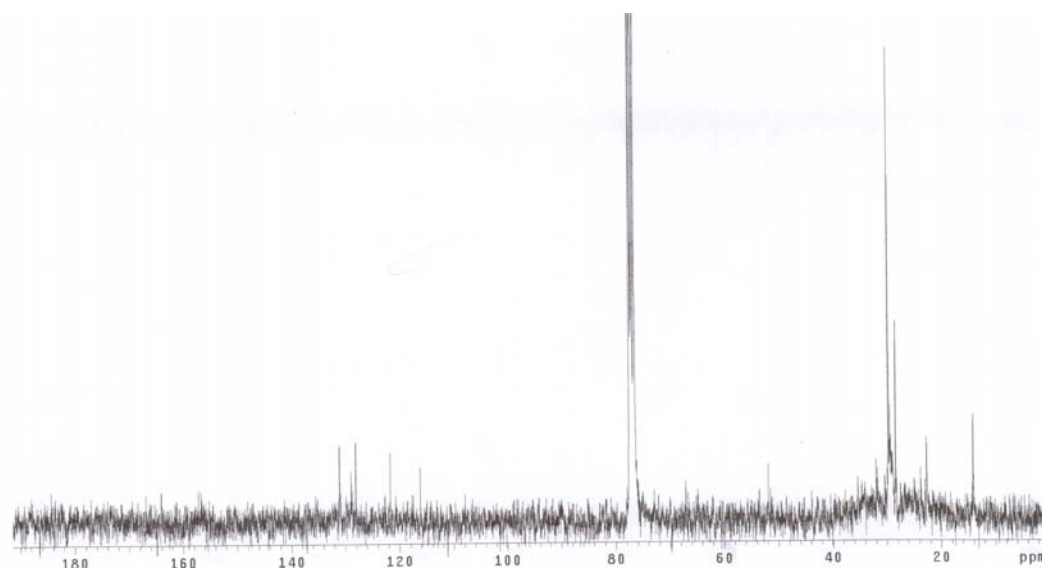


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C da substância **(6)** 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

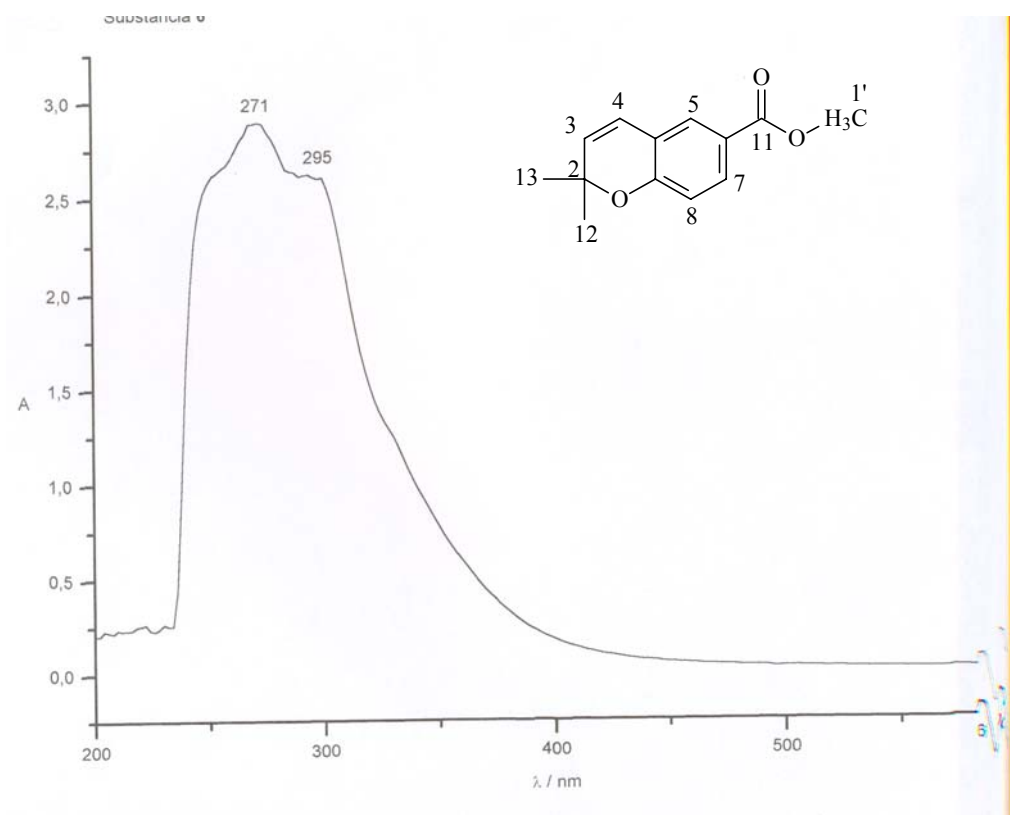


Figura 38. Espectro no ultravioleta da substância (**6**) 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona

Chromatogram Plot

File: c:\my documents\analises\bia\sirlei\laseracao fev2\fv22.sms
Sample: FVM22 6/28/00 11:30 AM
Sample Notes: 28/6/00; frutos verdes manha 22; 60/3/240/7/280/10; split off/ s
Operator: bia Scan Range: 1 - 4559 Time Range: 0.00 - 75.97 min.

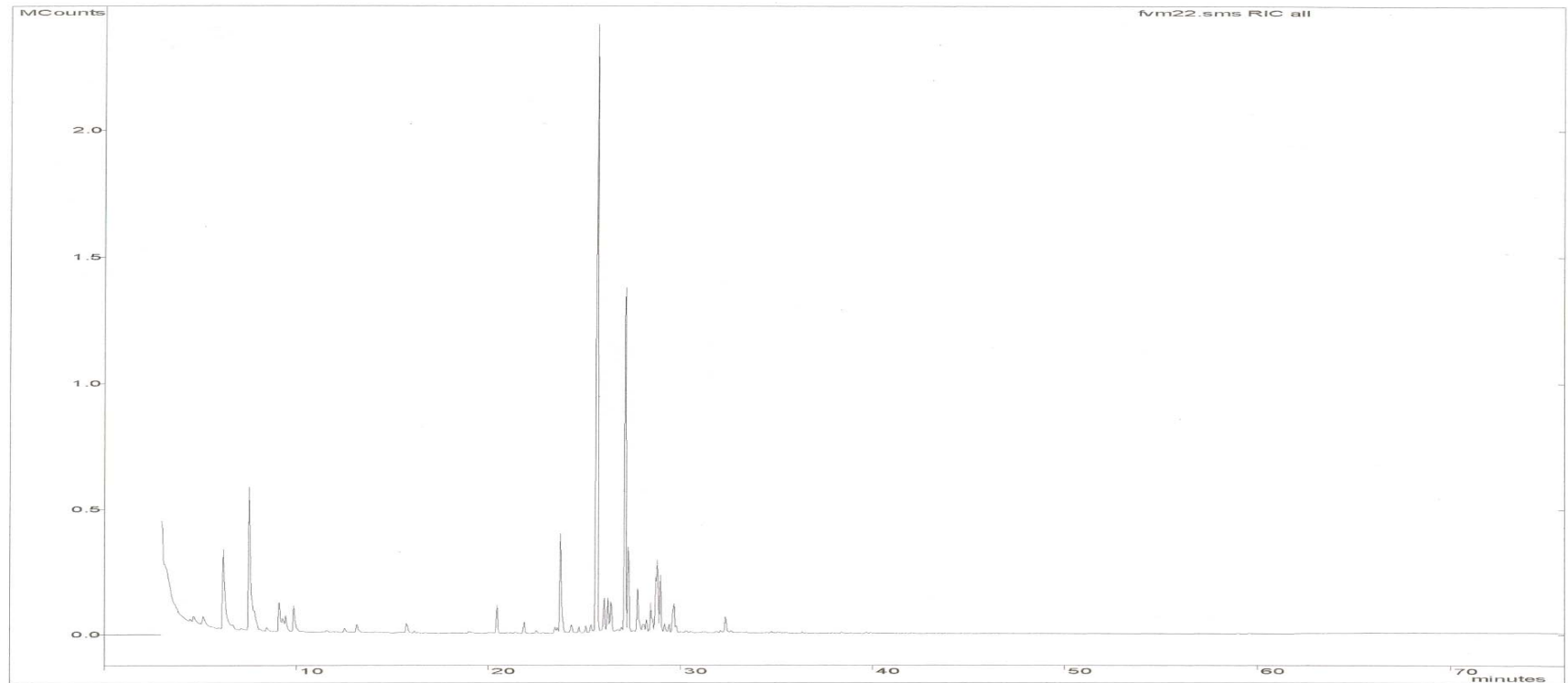


Figura 39. Cromatograma FI_m – Aeração

Chromatogram Plot

File: c:\my documents\analises\bia\serie1\ aeracao fev2\ fvt22001.sms

Sample: FVT22 6/28/00 2:33 PM

Sample Notes: 28/06/00, frutos verdes tarde 22, 60/3/240/7/280/10, split off/

Operator: bia

Scan Range: 1 - 4273 Time Range: 0.00 - 71.20 min.

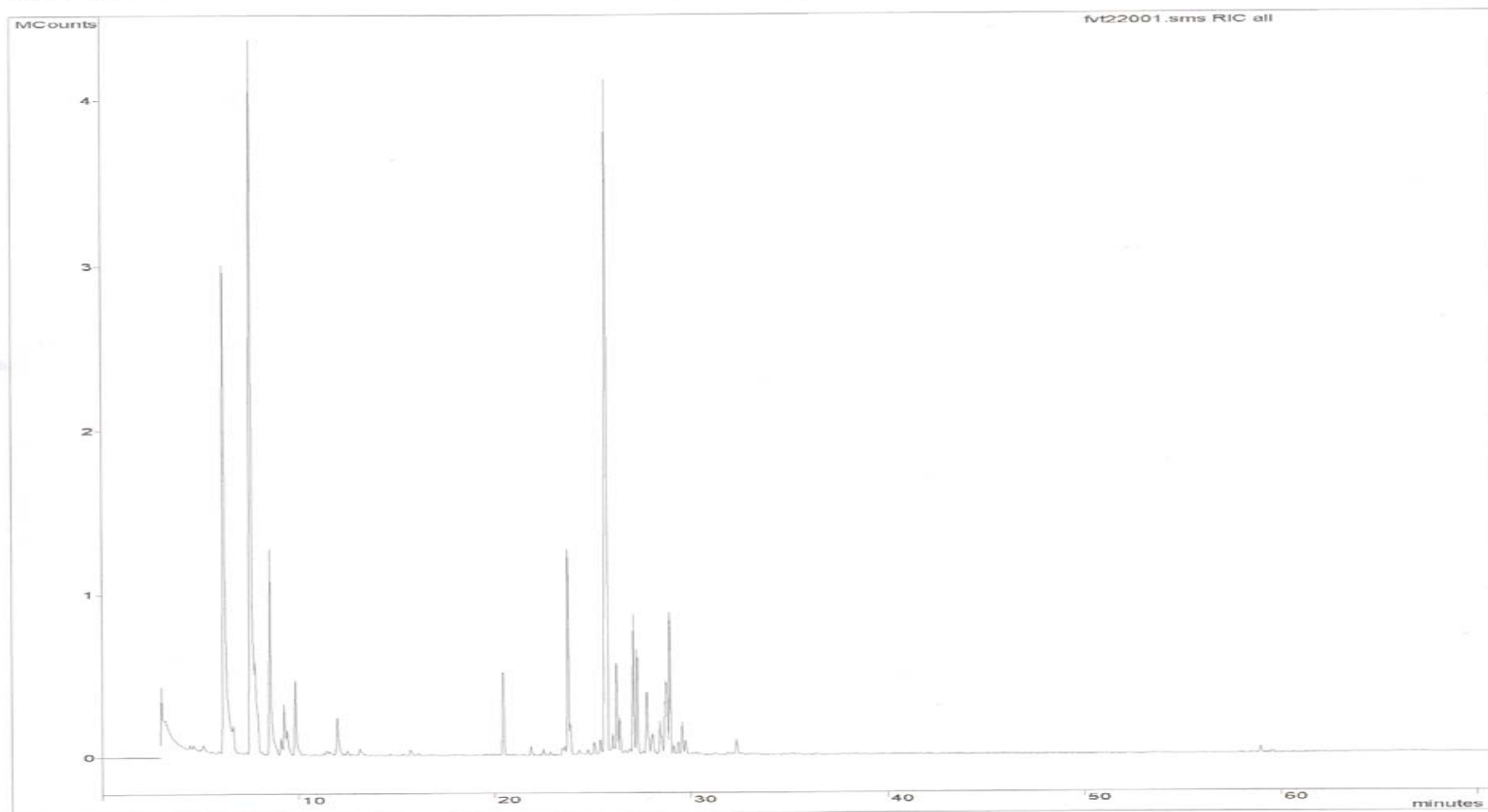


Figura 40. Cromatograma FI_t – Aeração

Chromatogram Plot

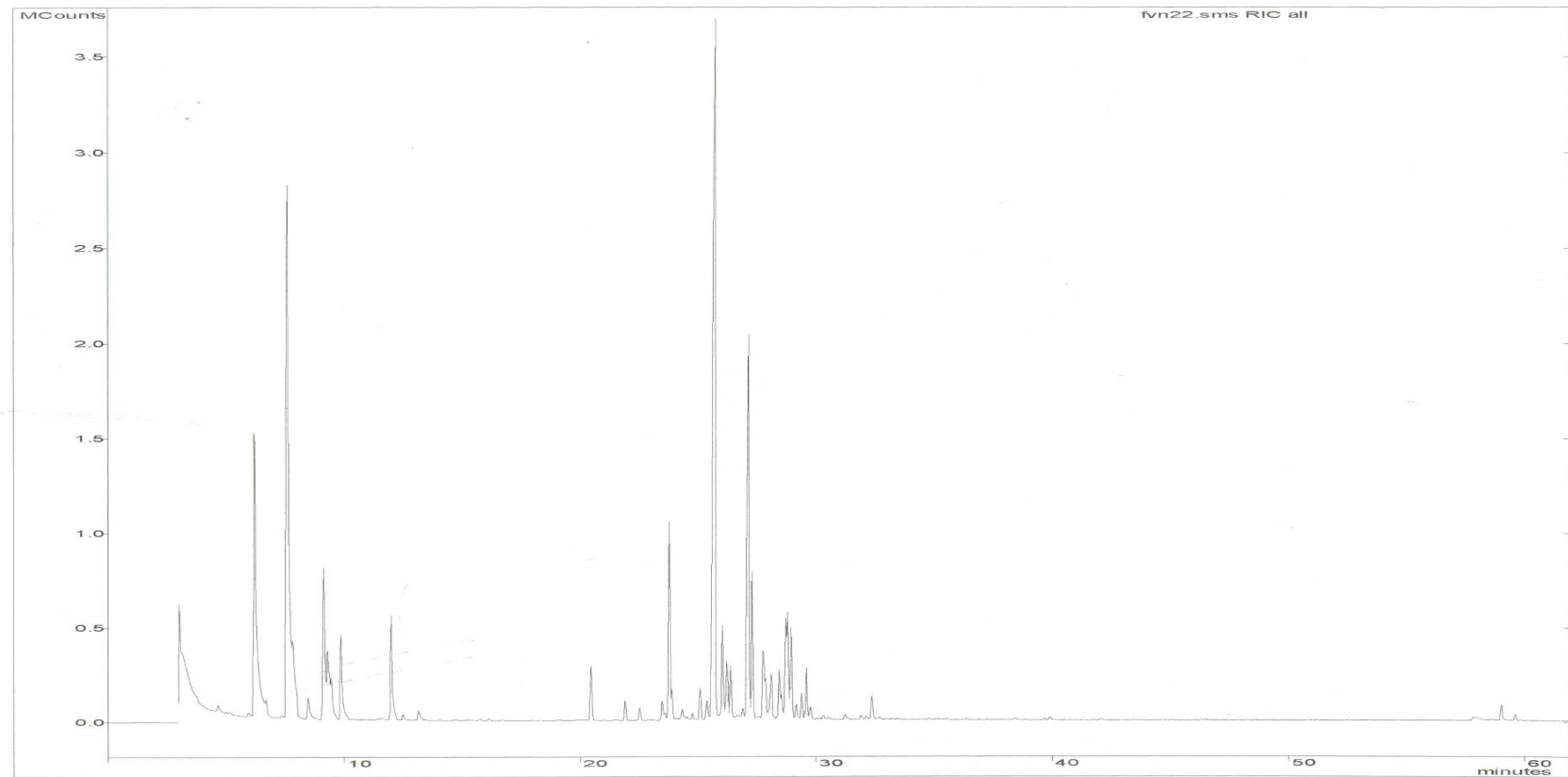
File: c:\my documents\analises\bia\serie\laeracao fev2\fvn22.sms

Sample: FVN22 6/28/00 1:09 PM

Sample Notes: 28/06/00, frutos verdes noite 22; 60/3/240/7/280/10; spplit off/

Operator: bia

Scan Range: 1 - 3717 Time Range: 0.00 - 61.93 min.

Figura 41. Cromatograma FI_n – Aeração

ng 99

Chromatogram Plot

File: c:\my documents\analises\bia\sirlei\ aeracao fev2\ fmm23.sms
Sample: FMM23 6/28/00 10:10 AM
Sample Notes: 28/6/00, frutos maduros manha 23, (60/3/240/7/280/10), splitl of
Operator: bia Scan Range: 1 - 4259 Time Range: 0.00 - 70.97 min.

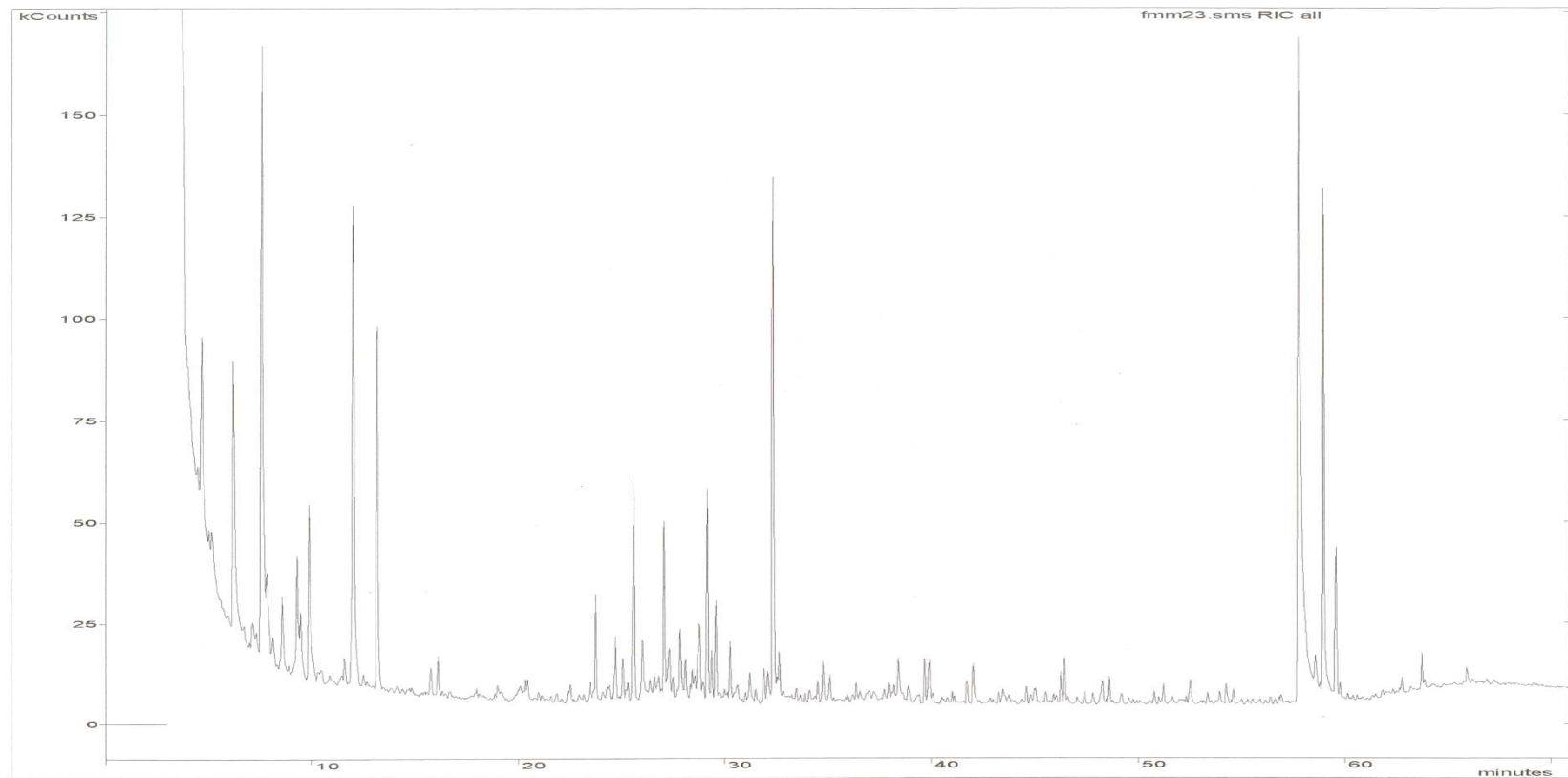


Figura 42. Cromatograma FM_m – Aeração

Print Date: 03 Jul 2000 14:39:44

FMT Fig. 44

Chromatogram Plot

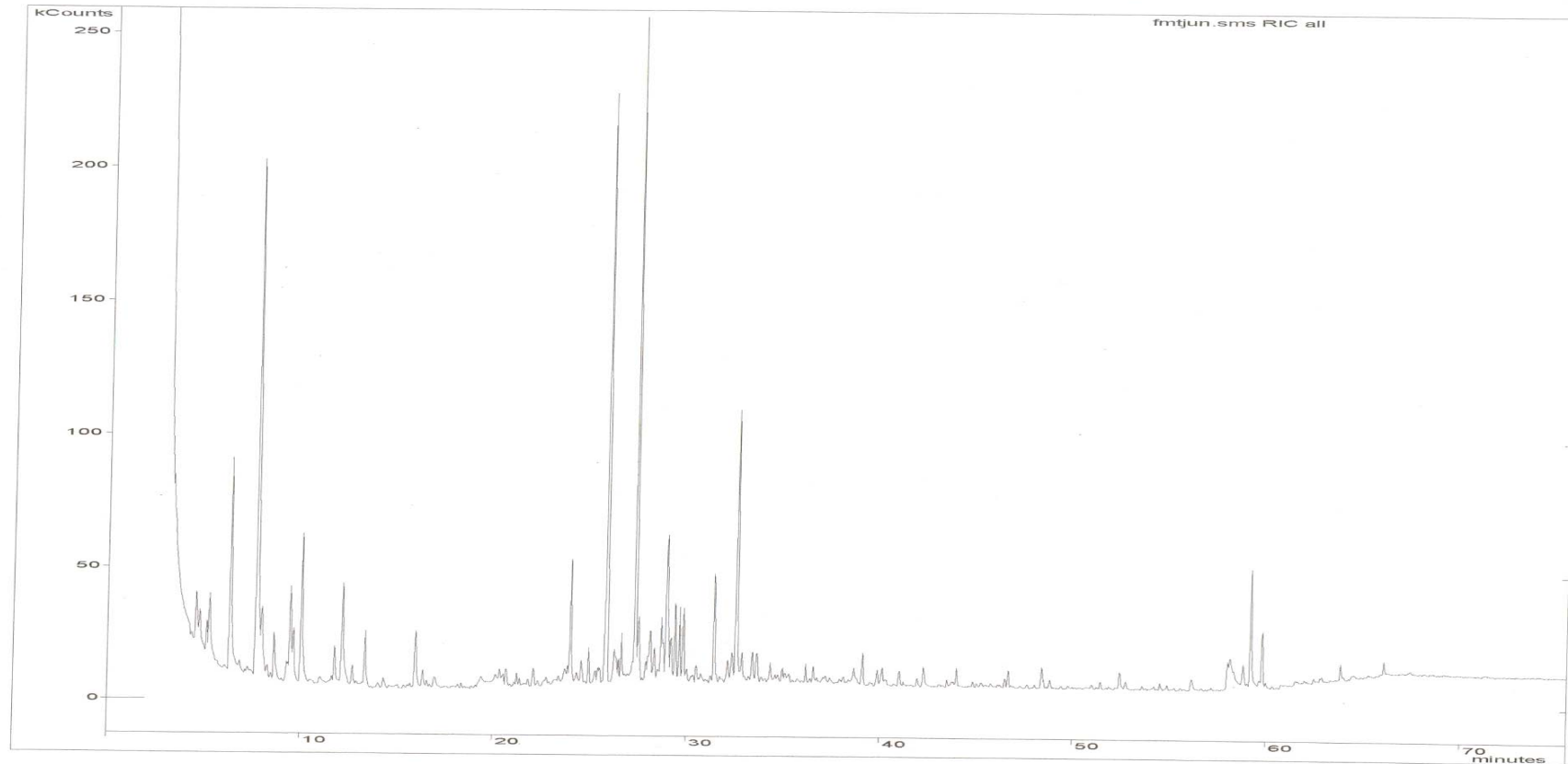
File: c:\my documents\analises\bia\sirlei\ aeracao fev\fmtjun.sms

Sample: FMTjun 6/9/00 12:03 PM

Sample Notes: frutos maduros tarde, junho/00, aeracao, 60/3/240/7/280, split 8

Operator: bia

Scan Range: 1 - 4596 Time Range: 0.00 - 75.54 min.

Figura 43. Cromatograma FM_t – Aeração

Chromatogram Plot

File: c:\my documents\analises\bia\sirlei\ aeracao fev\fmn22j.sms

Sample: FMN22j 6/9/00 4:03 PM

Sample Notes: frutos maduros noite 22; jun/00; aeracao, 60-3-240-7-280, split

Operator: bia

Scan Range: 1 - 4312 Time Range: 0.00 - 71.22 min.

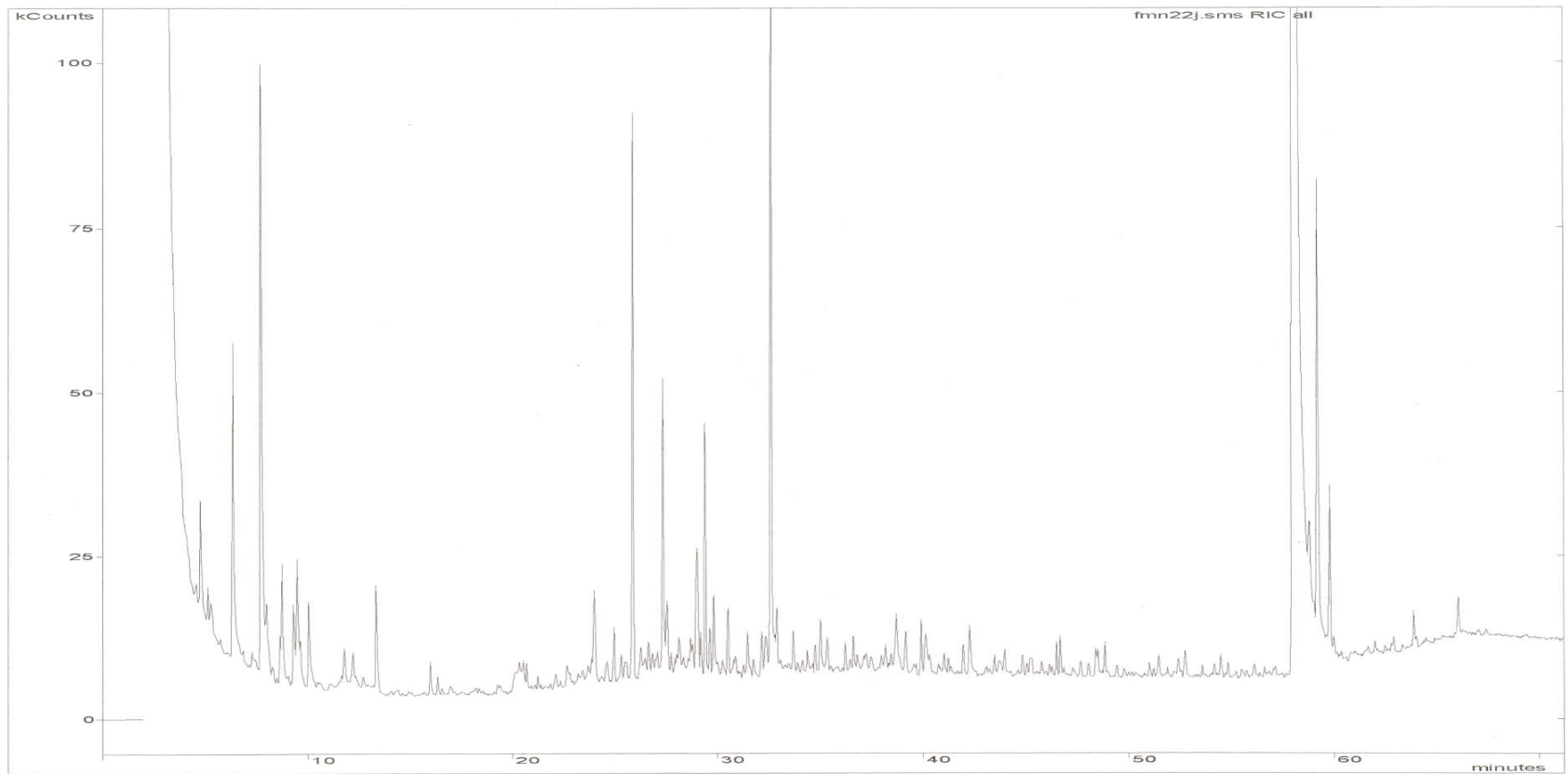


Figura 44. Cromatograma FM_n – Aeração

Print Date: 02 Aug 2001 09:05:16

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\analises\bia\sirlei\hidrodestilacao\fvmhidro6-12-01.sms

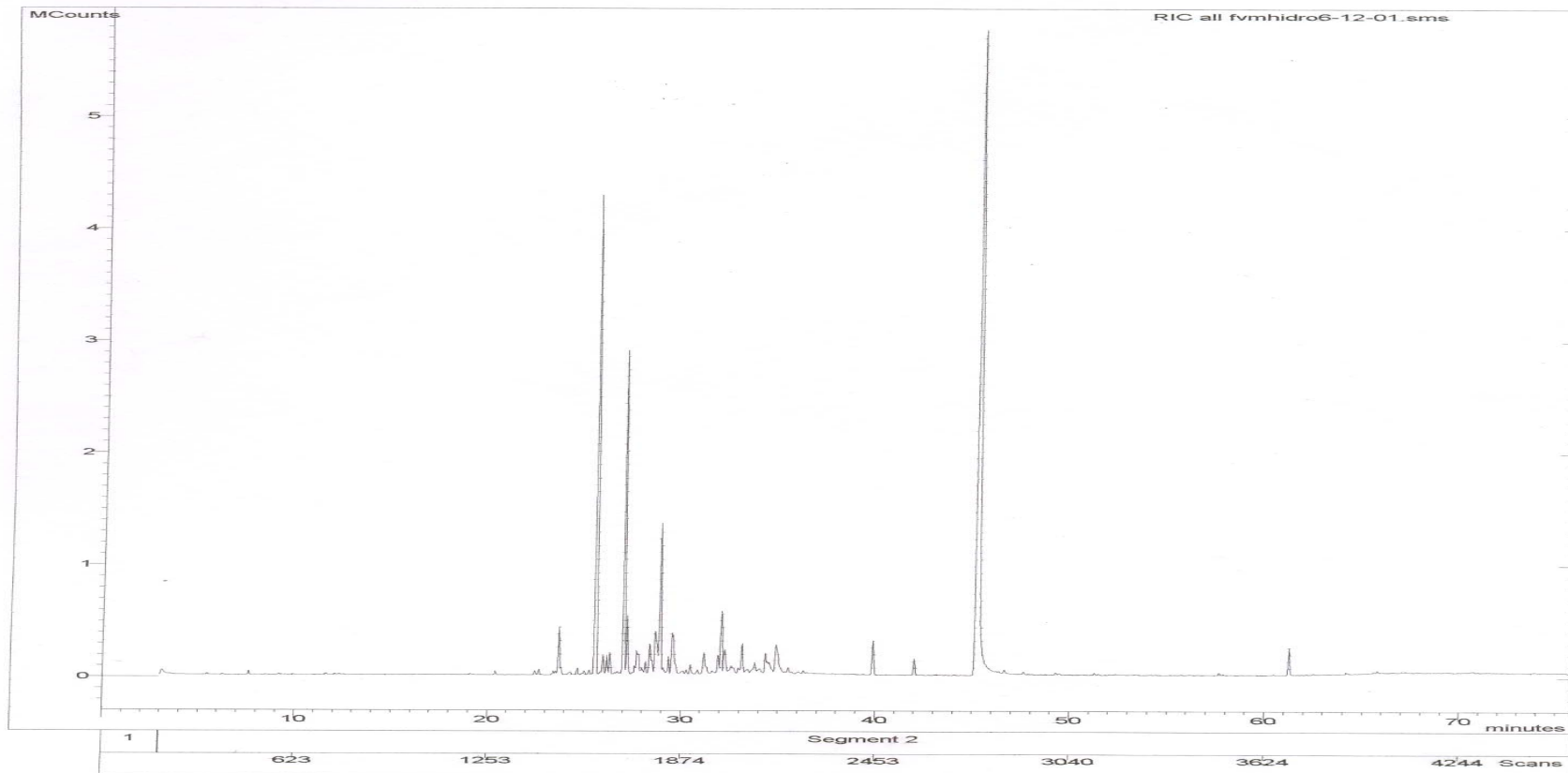
Sample: FVMhidro

Scan Range: 1 - 4609 Time Range: 0.00 - 75.97 min.

Sample Notes: FVMhidro 60-3-240 vol 1 ul inj. 250

Operator: SIRLEI

Date: 6/12/01 1:27 PM

Figura 45. Cromatograma FI_m – Hidrodestilação

Print Date: 02 Aug 2001 16:32:36

Fig 49

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\analises\bia\sirlei\hidrodestilacao\fvthidro6-12-01.sms

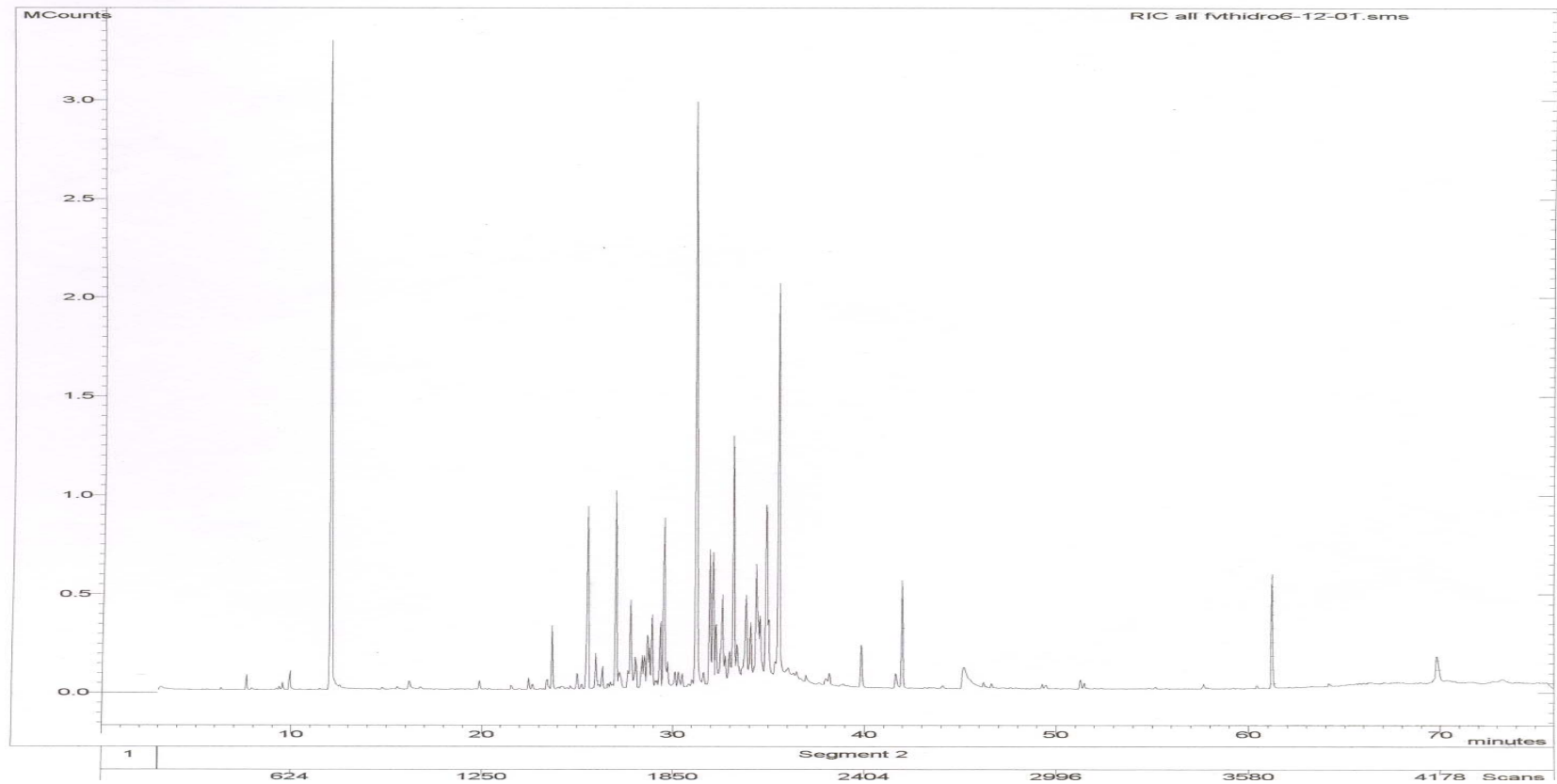
Sample: FVThidro

Scan Range: 1 - 4537 Time Range: 0.00 - 75.97 min.

Sample Notes: FVThidro 60-3-240 vol 1ul inj. 250

Operator: SIRLEI

Date: 6/12/01 3:22 PM

Figura 46. Cromatograma FI_t – Hidrodestilação

Print Date: 02 Aug 2001 17:37:12

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\analises\bis\sirlei\hidrodestilacao\fvnhydro6-12-01.sms

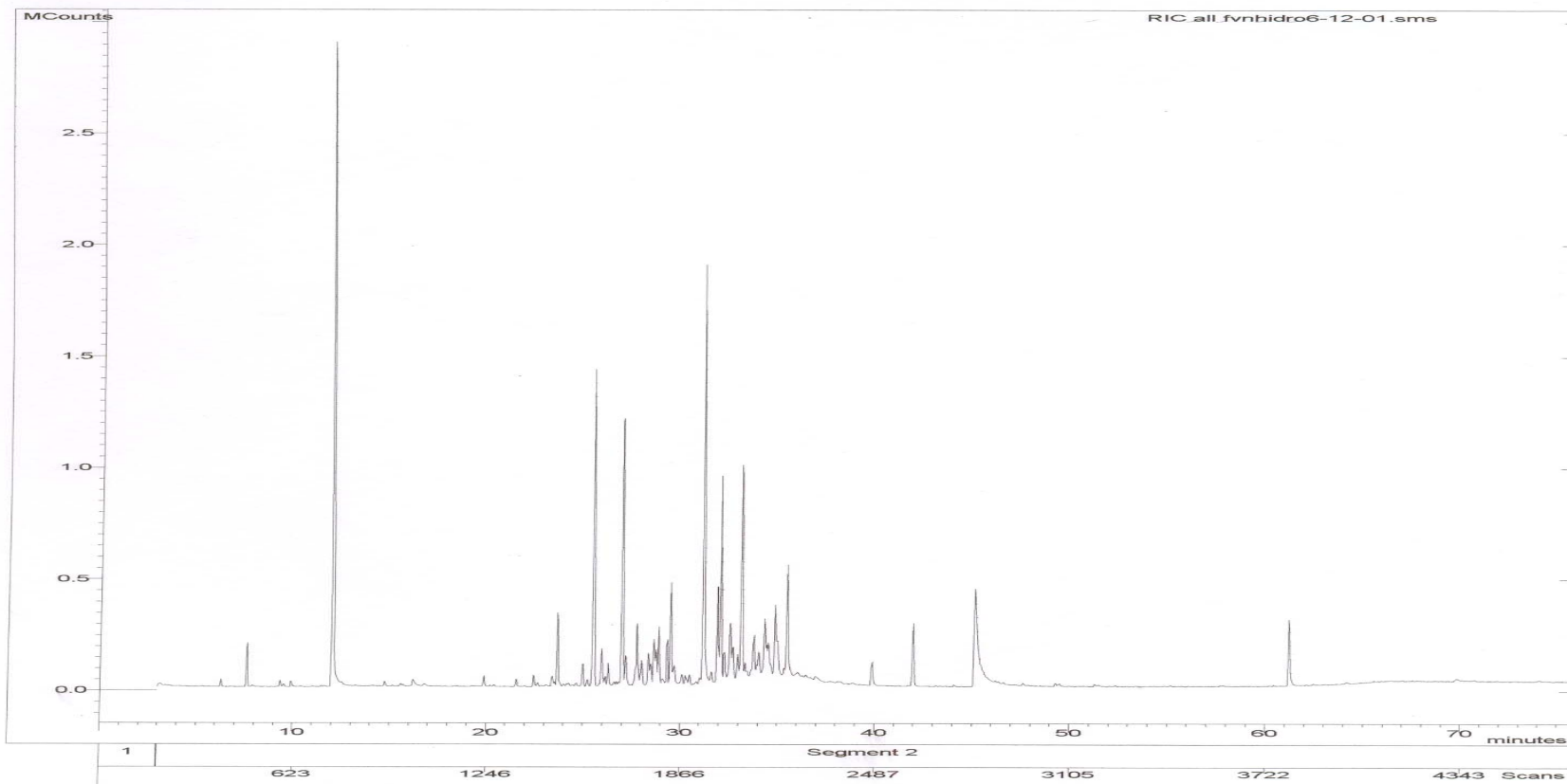
Sample: FVNhydro

Scan Range: 1 - 4712 Time Range: 0.00 - 75.97 min.

Sample Notes: FVNhydro 60-3-240 vol 1ul inj. 250

Operator: SIRLEI

Date: 6/12/01 5:01 PM

Figura 47. Cromatograma FI_n – Hidrodestilação

Print Date: 07 Jun 2001 09:58:06

Fig 51

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\analises\bial\sirlei\hidrodestilacao\fmh-hidrodest.sms

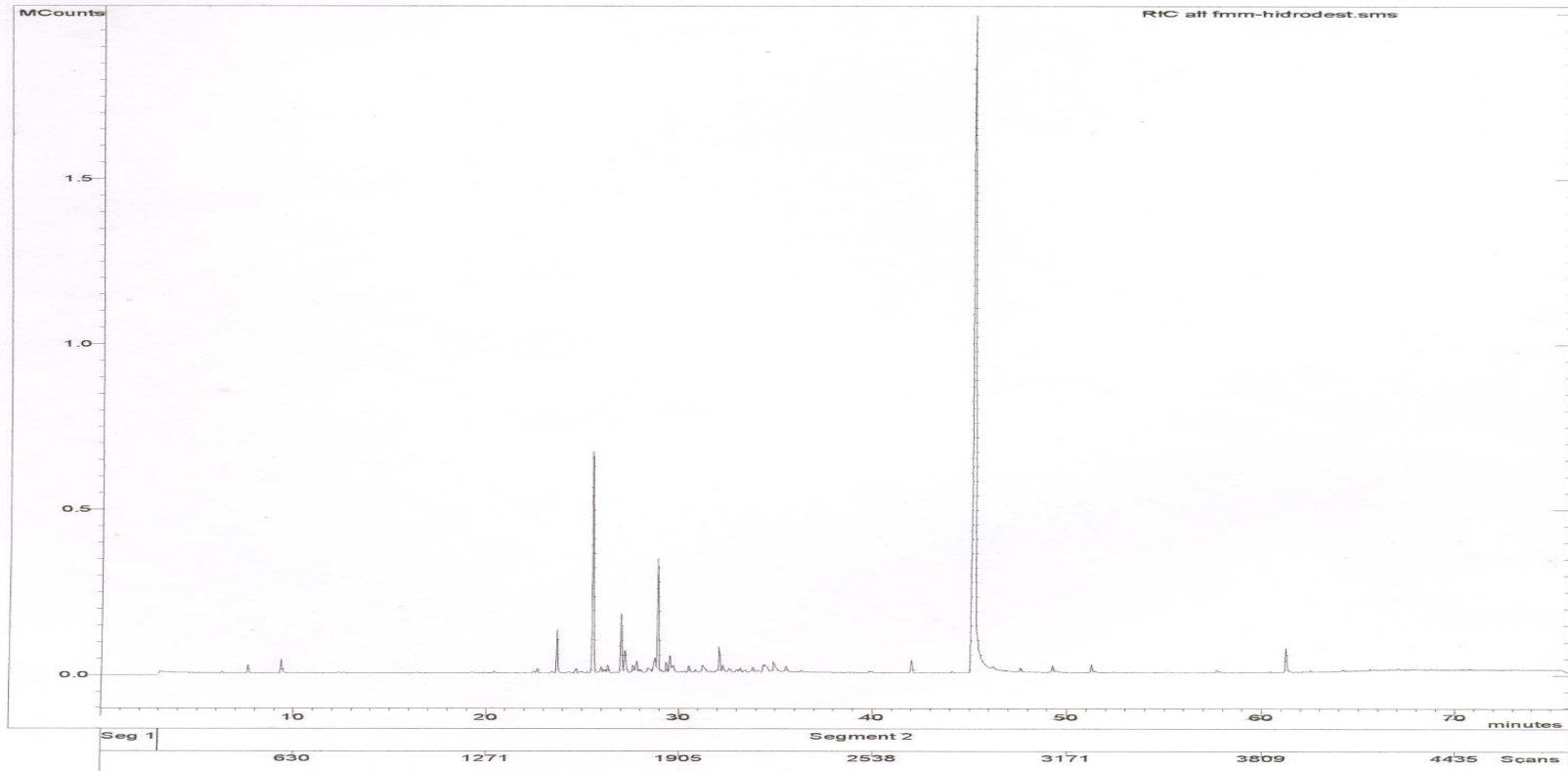
Sample: FMM-HIDRODEST

Operator: BIA

Scan Range: 1 - 4805 Time Range: 0.00 - 75.97 min.

Date: 6/6/01 11:35 AM

Sample Notes: frutos maduros manha - hidrodestilacao, 60-3-240, vol 1ul, inj.

Figura 48. Cromatograma FM_m – Hidrodestilação

int Date: 15 Jun 2001 10:56:12

Fig. 52 51

Chromatogram Plot

File: c:\saturhws\analises\bia\sirlei\hidrodestilacao\fmt hidrodest.sms

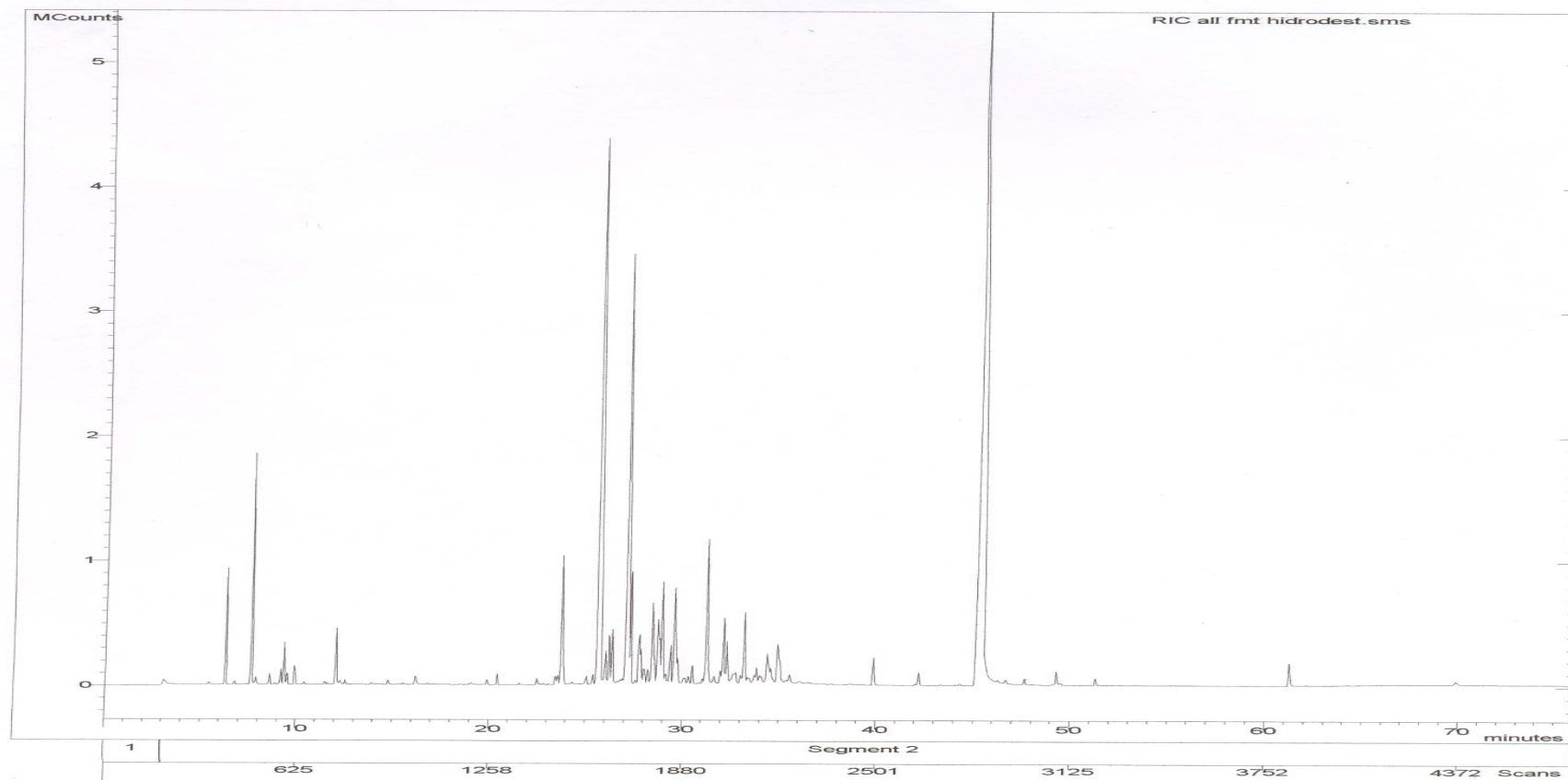
Sample: FMT HIDRODEST

Scan Range: 1 - 4738 Time Range: 0.00 - 75.97 min.

Operator: BIA

Date: 6/6/01 4:48 PM

Sample Notes: Frutos Maduros tarde hidrodestilacao, 60-3-240, inj.250, vol 1ul

Figura 49. Cromatograma FM_t – Hidrodestilação

Print Date: 01 Aug 2001 10:54:40

Fig 5352

Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\analises\bja\srle\hidrodestilacao\fmn hidrodest.sms

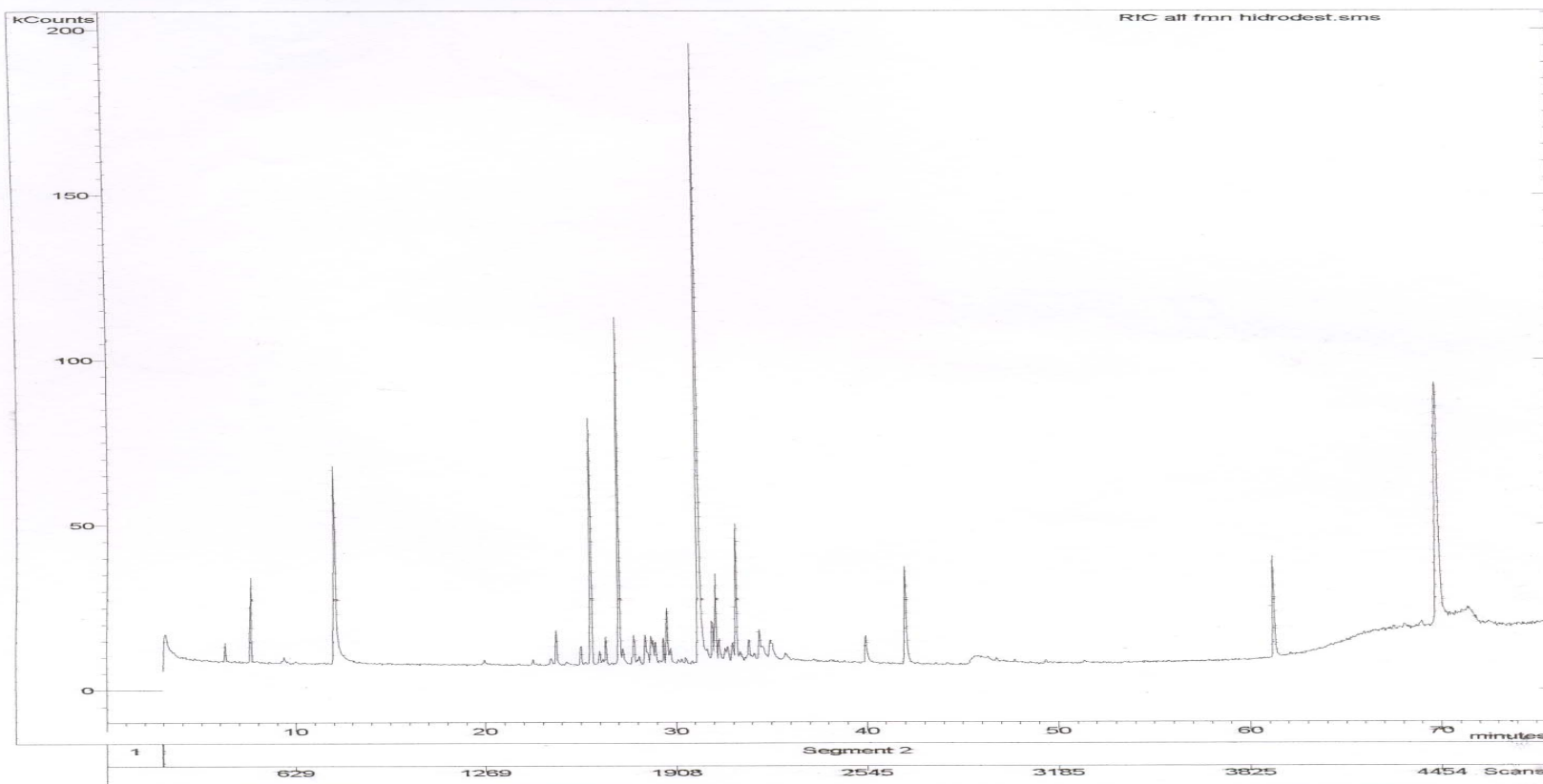
Sample: FMN HIDRODEST

Scan Range: 1 - 4822 Time Range: 0.00 - 75.98 min.

Sample Notes: Frutos maduros noite hidrodest., 60-3-240, inj.250, vol 1ul,

Operator: BIA

Date: 6/6/01 6:23 PM

Figura 50. Cromatograma FM_n - Hidrodestilação

